

Brucelosis ovina: reemergencia de *Brucella ovis* tras erradicar *Brucella melitensis*

A principios de los años 90, uno de cada cuatro rebaños de ovejas y cabras en España estaba infectado por *Brucella melitensis*, se registraban anualmente más de 3.000 casos humanos debidos a esta infección y, en consecuencia, las campañas oficiales de saneamiento se intensificaron siguiendo las directrices de obligado cumplimiento de la Unión Europea.

**Pilar M. Muñoz Álvaro y
José M. Blasco Martínez.**

Unidad de Producción y Sanidad Animal, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA) / Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza), Zaragoza.
pmmunoz@cita-aragon.es

Años antes de los 90, algunos veterinarios e investigadores ya advertíamos también de la alta incidencia de la infección por *Brucella ovis*, bacteria que causa la mal denominada "Epididimitis infecciosa del morueco" y que provoca graves problemas reproductivos e importantes pérdidas económicas en ganado ovino. Sin embargo, al no transmitirse a la especie humana, los programas sanitarios aplicados para erradicar *B. melitensis* nunca contemplaron el control de *B. ovis*. El importante esfuerzo realizado en las últimas décadas ha posibilitado erradicar la brucelosis ovina y caprina (BOC) causada por *B. melitensis* y, de hecho, la práctica totalidad del territorio español es Oficialmente Indemne de BOC. Por el contrario, la infección por *B. ovis* no solo ha permanecido durante todo este tiempo, sino que en los últimos años su prevalencia ha aumentado de manera exponencial en la práctica totalidad de nuestro territorio.

Una de las bases del éxito logrado en la erradicación de *B. melitensis* fue la vacunación con Rev I, una vacuna que también protege frente a la infección por *B. ovis* (Blasco, 2010). La utilización masiva de la vacuna Rev I en ganado ovino (que incluía la vacunación de los machos) puede explicar la baja incidencia de *B. ovis* du-



Palpación testicular de un morueco en busca de lesiones compatibles con *B. ovis*. Fuente: J.M. Blasco.

rante los años en los que se mantuvo la vacunación, por lo que sus repercusiones clínicas y económicas pasaron prácticamente desapercibidas. Sin embargo, en las fases avanzadas de la erradicación de *B. melitensis*, la normativa legal vigente (RD 2611/96 y RD 1047/03) prohíbe usar dicha vacuna para obtener la calificación sanitaria M4 (Oficialmente Indemne de BOC). En consecuencia, la vacunación con Rev I lleva ya interrumpida en España más de una década, por lo que los rebaños han perdido completamente la inmunidad, no solo frente a *B. melitensis*, sino también frente a *B. ovis*. En tales circunstancias solo cabía esperar una reemergencia de la infección por *B. ovis*, tal y como ya había ocurrido en Francia tan solo unos pocos

años después de la erradicación de *B. melitensis* y la consiguiente prohibición de Rev I (Picard-Hagen et al., 2015).

Que nosotros sepamos, salvo el País Vasco, ninguna otra comunidad autónoma aplica programas específicos para el control de *B. ovis*. Navarra ha realizado también algún programa sanitario específico, pero solo de manera parcial y discontinuada. Aprovechando las muestras de suero tomadas en la campaña de erradicación de *B. melitensis*, Aragón ha sido una de las pocas regiones españolas en las que se ha realizado un seguimiento continuo de la infección por *B. ovis* en la práctica totalidad de machos ovinos, pero, al no existir compensación oficial alguna, la eliminación de los animales positivos ha sido siempre



Figura 1. Evolución de la seroprevalencia individual (determinada exclusivamente en moruecos) y colectiva (% de rebaños positivos) de la infección por *B. ovis* en Aragón desde la retirada de la vacunación con Rev 1 en el año 2010.

| AÑO | Nº sueros testados | Nº sueros positivos | % sueros positivos | Nº rebaños analizados | % rebaños analizados | Nº rebaños positivos | % rebaños positivos |
|------|--------------------|---------------------|--------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|
| 2010 | 29608 | 120 | 0,41 | 4062 | 100 | 90 | 2,22 |
| 2015 | 31890 | 384 | 1,20 | 2988 | 100 | 112 | 3,75 |
| 2016 | 32455 | 458 | 1,41 | 2915 | 100 | 137 | 4,70 |
| 2017 | 14426 | 215 | 1,65 | 1091 | 41,34 | 52 | 4,77 |
| 2018 | 10820 | 215 | 1,99 | 818 | 31,00 | 69 | 8,44 |
| 2019 | 9155 | 279 | 3,05 | 730 | 27,66 | 69 | 9,45 |

Nota: Hasta 2016 se analizaban anualmente los machos de todas las explotaciones. A partir de 2016 se analizan todos los moruecos de aproximadamente un tercio de los rebaños aragoneses.

Fuente: C.M. Marín et al. 2019. *Re-emergence of Brucella ovis infection in Aragón (Spain) after the ban of Rev 1 vaccination. In: International Brucellosis Society Meeting, Chicago, EEUU.*

voluntaria y a expensas de los ganaderos. La evolución de la seroprevalencia de esta infección en Aragón desde que se prohibiera la vacunación con Rev 1 (hace ya más de 10 años) se presenta en la **figura 1**. Como puede apreciarse, el porcentaje de rebaños positivos entre 2010 (2,22%) y 2019 (9,45%) se ha cuadruplicado y la prevalencia individual se ha multiplicado por nueve. Aunque no existen datos publicados, la incidencia de este patógeno también está aumentando de manera similar y muy preocupante en otras comunidades autónomas (P.M. Muñoz, datos no publicados). El escenario a corto plazo es muy sombrío puesto que una vez prohibida la vacunación con Rev 1 y en ausencia total de inmunidad y de medidas específicas de control, es previsible que la prevalencia de *B. ovis* aumente todavía más en la práctica totalidad de rebaños ovinos españoles.

LAS VÍAS DE TRANSMISIÓN

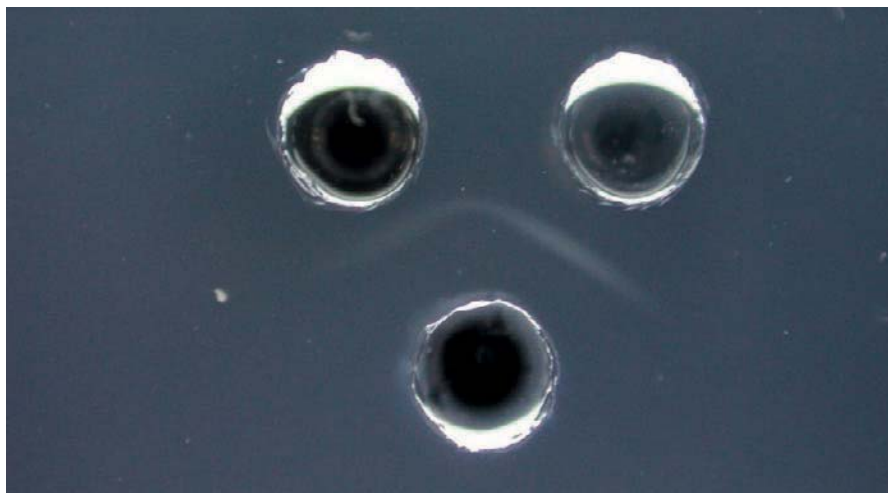
La vigilancia clínica (mediante palpación genital) y serológica de los machos es de gran utilidad para la detección de la infección en los rebaños, aunque siempre es recomendable confirmarla mediante un diagnóstico bacteriológico preciso. La transmisión venérea pasiva de morueco a morueco a través de la oveja durante la cubrición es la vía de contagio más importante. La transmisión entre machos

también se produce durante los períodos de estabulación a través de las prácticas homosexuales de establecimiento de la jerarquía (para revisión ver Blasco, 2010). Es un error muy extendido considerar que *B. ovis* afecta exclusivamente al morueco y que solo los machos están involucrados en la transmisión de la infección. Sin embargo, está científicamente demostrado que *B. ovis* coloniza de manera similar los órganos reproductivos y ganglios linfáticos de moruecos y ovejas, que se excreta tanto en semen como en fluidos vaginales (tras el aborto o parto normal) y que la excreción en la leche puede ser copiosa y duradera. Un alto porcentaje de las ovejas infectadas experimentalmente desarrollan una intensa infección mamaria, caracterizada por una excreción de *B. ovis* en la leche que, en algunos animales, persiste durante al menos dos lactaciones sucesivas (Grilló et al., 1999). Aunque los abortos no son muy frecuentes, la excreción por vía vaginal tras un parto normal o prematuro ocurre en una proporción elevada de ovejas infectadas. Por tanto, la hembra juega un importante papel en el mantenimiento y propagación de la infección dentro del rebaño y ello explica el fracaso de los programas de control y erradicación basados únicamente en la eliminación de machos infectados (Marco et al., 1994). Por otra parte, los corde-

ros nacidos de ovejas infectadas rara vez desarrollan una infección activa, pero la infección congénita no debe descartarse. La excreción en leche podría ser de relevancia en la transmisión perinatal a los corderos lactantes, con posibilidad de generar peligrosas infecciones latentes (animales infectados pero sin anticuerpos detectables). Si bien la existencia de este fenómeno no ha sido demostrada en *B. ovis*, ha quedado bien demostrado para las infecciones producidas por *B. abortus* en bovino (Plommet et al., 1973) y *B. melitensis* en ovino y caprino (Grilló et al., 1999).

CLÍNICA Y DIAGNÓSTICO

Los signos clínicos más frecuentes producidos por *B. ovis* son las alteraciones testiculares (orquitis y epididimitis) en los moruecos. Por ello, realizar palpaciones testiculares de manera periódica puede resultar útil para detectar casos sospechosos de infección y eliminar los machos afectados. Sin embargo, el valor diagnóstico de la palpación testicular es limitado ya que tan solo un porcentaje moderado de los machos infectados por *B. ovis* desarrollan lesiones testiculares. Además, otros patógenos (*Actinobacillus seminis*, *A. actinomycetencomitans*, *Histophilus ovis*, *Haemophilus spp.*, *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* o *Chlamydophila abortus*, entre otros) causan alteraciones testiculares, incluso con mayor frecuencia que *B. ovis* (Gar-



Bandas de inmunoprecipitación obtenidas en gel de agarosa (IDGA) al analizar sueros de ovejas infectadas por *B. ovis* (dispensados en los pocillos superiores) utilizando el antígeno rugoso (HS) de esta bacteria (dispensado en el pocillo inferior). Fuente: P.M Muñoz.

cía-Pastor; 2006). Como ya se ha indicado, aunque de manera relativamente infrecuente, las ovejas infectadas por *B. ovis* pueden desarrollar inflamación placentaria que causa subnutrición fetal y, por tanto, abortos y/o un aumento de la mortalidad perinatal. En consecuencia, el diagnóstico clínico de la infección es meramente orientativo y para realizar un diagnóstico inequívoco es preciso recurrir al laboratorio.

Para el diagnóstico bacteriológico de *B. ovis* en moruecos vivos la muestra idónea es el semen. Este puede obtenerse mediante electroeyaculación y recogerse en contenedores estériles o mediante hisopos tomados de la cavidad prepucial o vaginal inmediatamente después de la monta. Aunque de menor sensibilidad, los hisopos prepuciales y la orina son también muestras interesantes y prácticas. Muestras de leche y de fluidos vaginales (escobillón vaginal recogido en el momento o pocos días después del aborto o parto prematuro) son las más adecuadas en las ovejas. Para el diagnóstico *postmortem* en machos, las muestras más idóneas son ambos epidídimos, las glándulas sexuales accesorias, los linfonodostesticulares y el bazo.

En las ovejas, el útero, bazo y los ganglios ilíacos y supramamarios son las muestras que proporcionan mayor sensibilidad. Todas las muestras deben procesarse lo antes

posible tras su recogida (idealmente en las primeras 24 horas) y cultivarse en los medios selectivos adecuados. La congelación de las muestras no es recomendable ya que *B. ovis* es muy sensible a la congelación. El medio de Farrell, habitualmente utilizado para el diagnóstico bacteriológico de *B. abortus* y *B. melitensis*, inhibe el crecimiento de *B. ovis*. La siembra de las muestras por duplicado en los medios de Thayer-Martin modificado y CITA resulta en la sensibilidad diagnóstica óptima (De Miguel *et al.*, 2011).

La bacteriología es imprescindible para la confirmación de los brotes pero no es útil para el diagnóstico individual. Para este diagnóstico a gran escala debemos recurrir a las pruebas serológicas. Las técnicas que se utilizan para la detección de anticuerpos frente a *B. melitensis* o *B. abortus*, como la aglutinación con Rosa de Bengala o la Fijación de Complemento, no son adecuadas para la detección de infecciones por *B. ovis*, ya que su antígeno inmunodominante es un lipopolisacárido rugoso (R/LPS) desprovisto de cadena O y, por tanto, diferente del lipopolisacárido liso (S/LPS) de *B. abortus* y *B. melitensis*. Por tanto, para el diagnóstico serológico de *B. ovis* se necesitan pruebas específicas basadas en extractos antigénicos ricos en R/LPS (para revisión ver Blasco 2010). Las pruebas serológicas más recomendables

son la Inmunodifusión en Gel de Agar (IDGA), la Fijación del Completo (FC) y el ELISA indirecto, todas ellas usando un extracto salino (HS) de *B. ovis* rico en R/LPS. Por su sensibilidad, simplicidad, fácil interpretación y bajo coste la IDGA es la prueba más recomendable. En Aragón se viene utilizando desde hace décadas para el diagnóstico de *B. ovis*, aunque su uso está poco extendido en otras regiones, probablemente debido a la falta de antígenos o kits comerciales y de métodos estandarizados. Por ello, la prueba de uso oficial para el comercio internacional de moruecos es la FC, a pesar de su menor sensibilidad y de otras desventajas importantes como su complejidad, la necesidad de inactivar previamente los sueros, la dificultad de realizarla en muestras hemolizadas, la actividad anticomplementaria de algunas muestras de suero y los fenómenos de zona, que invalidan muchos resultados. Existen varios ELISA indirectos, alguno de ellos comercializado, que no mejoran la sensibilidad de la IDGA y requieren de una adecuada y relativamente compleja validación para establecer sus puntos de corte (Blasco 2010).

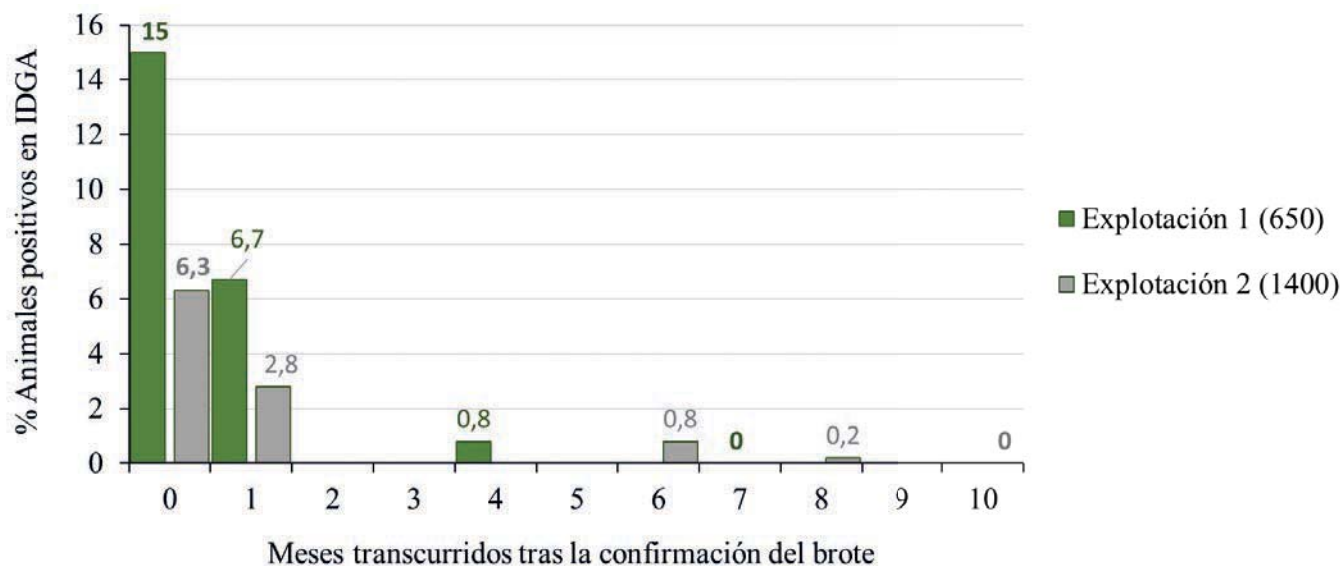
Un problema muy relevante del diagnóstico serológico de *B. ovis* es que conocemos muy poco sobre la frecuencia y origen de las reacciones serológicas positivas falsas. Hasta el momento, se ha demostrado reactividad cruzada con, al menos, *Dichelobacte rnodosus* (Whittington *et al.*, 1996) JM Blasco y S Piriz, datos no publicados) y con *Corynebacterium ovis* (JM Blasco e I Moriyón, datos no publicados), lo que dificulta el diagnóstico de la infección por *B. ovis* en rebaños afectados por pederio y linfadenitis caseosa. Es por ello que toda sospecha de infección basada en resultados clínicos y serológicos debería confirmarse (al menos a nivel de rebaño) con el diagnóstico bacteriológico antes de adoptar las correspondientes medidas de control.

ESTRATEGIAS DE CONTROL

Existen algunos estudios sobre el uso de antibióticos frente a la infección por



Figura 2. Evolución de la prevalencia individual de *B. ovis* en dos explotaciones ovinastras confirmarse la infección mediante serología y bacteriología (mes 0) y aplicar un programa de diagnóstico serológico y sacrificio*.



*Se realizaron análisis serológicos con la IDGA a la totalidad de animales adultos del rebaño (el número aproximado se indica entre paréntesis) de manera repetida a intervalos de dos a cuatro meses. Los animales positivos fueron sacrificados inmediatamente después de cada análisis.

Fuente: P.M. Muñoz y M.J. De Miguel, datos no publicados.

B. ovis. De hecho, la combinación de oxi-tetraciclina de acción prolongada (siete inoculaciones de 20 mg / kg PV a intervalos de tres días) con sulfato de dihidroestrep-tomicina (20 mg / kg PV diarios durante 21 días) es muy eficaz (Marín *et al.*, 1989). No obstante, por su elevadísimo coste, el tratamiento antibiótico solo se justificaría en animales de altísimo valor económico o biológico, como pueden ser los procedentes de programas de selección genética o de razas en peligro de extinción.

En áreas con alta prevalencia (que es la actual situación en España) la vacunación es, sin duda, la estrategia más económica, eficaz y práctica para el control de la infección por *B. ovis*. La evidencia experimental (Blasco 2010) así como la experiencia práctica adquirida durante las últimas décadas en España demuestran que la vacunación de los corderos de reposición (machos y hembras) con Rev I (la única vacuna disponible) permite controlar eficazmente la infección, minimizando su incidencia clínica y económica. Lamentablemente, ante la prohibición de

vacunar con Rev I, la única alternativa de control consiste en el vaciado sanitario de la explotación (inviabile en la mayoría de casos) o en el establecimiento de una estrategia de diagnóstico y sacrificio seriada y aplicada a la totalidad del rebaño (machos y hembras). Como puede apreciarse en la **figura 2**, un programa de diagnóstico y sacrificio de esta naturaleza permite erradicar la infección en relativamente poco tiempo. En esta experiencia realizada en dos rebaños de Aragón, todos los animales adultos (mayores de un año) fueron analizados serológicamente mediante IDGA a intervalos variables de entre dos y cuatro meses y todos los positivos fueron sacrificados inmediatamente después de cada análisis. Como puede apreciarse, aun partiendo de prevalencias individuales muy elevadas (15% en la explotación de 650 animales y 7% en la de 1.400) y después de realizar varias rondas de diagnóstico y sacrificar un total de 140 (un macho y 139 hembras) y 127 (49 machos y 78 hembras) animales, respectivamente, se lograron los primeros resultados negativos

pasados entre siete y diez meses. Una vez logrado este primer resultado negativo, es recomendable repetir las analíticas cada cinco o seis meses o, al menos, antes de cada periodo de cubrición, hasta obtener, idealmente, dos o tres resultados negativos consecutivos. El éxito de esta estrategia a medio y largo plazo reside en evitar nuevos contagios, por lo que la reposición debe proceder de rebaños libres y ser controlada estrictamente a la entrada. Desde luego, el coste de esta estrategia de erradicación es elevadísimo y, ante la ausencia de ayudas oficiales es muy improbable que sea aceptada por los ganaderos. Además, si las vías de entrada del patógeno no están bajo control o se trata de rebaños trashumantes o que comparten pastos con otros rebaños de situación sanitaria desconocida, es prácticamente imposible controlar la infección sin recurrir a la vacunación. Así lo entendieron nuestros vecinos franceses de las regiones de los Pirineos Atlánticos y PACA cuando en 2012, varios años después de la prohibición de Rev I, lograron que la UE

permitiese de nuevo el uso de esta vacuna en estas zonas dada la elevadísima prevalencia que padecían. Lamentablemente, esta experiencia no resultó demasiado satisfactoria y los progresos obtenidos en los siguientes cinco años fueron escasos (Dion F, comunicación personal), seguramente debido a que no todos los ganaderos se adhirieron al programa de vacunación y, sobre todo, a que solo se vacunaron los machos de reposición dejando las corderas fuera de cobertura vacunal. Por tanto, para ser eficaz, la vacunación debe realizarse en la totalidad del censo de reposición. Desafortunadamente, la vacunación con Rev 1 en áreas Oficialmente Libres de BOC (tal y como actualmente ocurre en la práctica totalidad de rebaños españoles) implica la pérdida de la calificación sanitaria M4, que pasaría a ser M3. Esto no supone ninguna desventaja desde el punto de vista sanitario sino más bien al contrario, ya que los rebaños M3 se mantienen libres de BOC y, además, quedan protegidos frente a la infección por *B. ovis*. Lamentablemente, la normativa vigente para los rebaños M3 establece restricciones muy serias al comercio de animales vivos, por lo que, de no hacerse una excepción por parte de las autoridades sanitarias, resultaría inaceptable para los ganaderos.

LA INVESTIGACIÓN DE NUEVAS VACUNAS

En las actuales circunstancias de imposibilidad de utilización de la vacuna Rev 1, el desarrollo de nuevas vacunas frente *B. ovis*, que no interfirieran en el diagnóstico serológico de *B. melitensis*, cobra especial interés. Nuestro grupo lleva muchos años trabajando en ello y, de hecho, hemos desarrollado varias vacunas subcelulares tan eficaces como Rev 1 (Blasco, 2010). Lamentablemente, todas estas vacunas requieren costosos procedimientos de obtención, por lo que resultan muy caras y fuera de precios de mercado razonables. Otros investigadores han desarrollado también vacunas que han publicado como eficaces frente a *B. ovis* (Díaz *et al.*, 2019, Silva *et al.*, 2015a, Silva *et al.*, 2015b). Sin

embargo, los experimentos realizados por estos autores poseen graves defectos metodológicos que cuestionan totalmente los resultados obtenidos.

La alternativa más eficaz y menos costosa para inmunizar contra la brucelosis animal son las vacunas vivas atenuadas. Para evitar el problema de la interferencia diagnóstica con *B. melitensis*, se ha investigado el uso de las denominadas vacunas rugosas (R) que, al igual que *B. ovis*, presentan un R/LPS libre de cadena O (principal antígeno detectado por las pruebas de diagnóstico de *B. melitensis*). De entre ellas, la vacuna *B. abortus* RB51 es la única comercializada actualmente. Además de otros inconvenientes, esta vacuna no protege frente a *B. ovis* (para revisión ver (Moriyón *et al.*, 2004)). Recientemente, nuestro grupo de investigación ha desarrollado una cepa vacunal R (obtenida de *B. melitensis*) que indujo una protección frente a la infección experimental por *B. ovis* similar a la de Rev 1.

Desafortunadamente, aún en el caso de que encontrásemos un socio comercial interesado en invertir en este producto, el registro de esta vacuna en la Agencia del Medicamento llevaría muchos años. Concedores de la importancia y gravedad de la infección por *B. ovis*, nuestro grupo de investigación continúa trabajando en el desarrollo de nuevas vacunas frente a este patógeno. Mientras no se ponga en el mercado una vacuna específica frente a *B. ovis*, los ganaderos y técnicos del sector tendrán que buscar la manera de convivir con esta infección enfrentándose a ella con los escasos recursos de los que se disponen. Sin embargo, dada la larga y profunda crisis del sector ovino Español, es muy improbable que los ganaderos puedan asumir los importantes costes de un programa de control basado en el diagnóstico y sacrificio de los machos y hembras afectadas sin contar con el apoyo técnico y económico de la Administración. ■

Referencias bibliográficas

- Blasco, J. M. (2010) 'Brucella ovis Infection', in Lefèvre, P.C., Blancou, J.C., Chermette, R. & Uilenberg, G. (eds.) *Infectious and Parasitic Diseases of Livestock*. Paris, France: Lavoisier, pp. 1047-1063.
- De Miguel, M. J. *et al* (2011) 'Development of a selective culture medium for primary isolation of the main Brucella species', *Journal of Clinical Microbiology*, 49 (4), pp. 1458-1463.
- Díaz, A. G. *et al* (2019) 'Mucosal immunization with polymeric antigen BLSOmp31 using alternative delivery systems against Brucella ovis in rams', *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 209, pp. 70-77.
- García-Pastor, L. (2006) Tesis doctoral: Alteraciones testiculares en moruecos. Estudio clínico, serológico, microbiológico y anatomopatológico. Universidad de Zaragoza.
- Grilló, M. J. *et al* (1999) 'Experimental Brucella ovisinfection in pregnant ewes', *Vet. Record*, 144 (20), pp. 555-+.
- Marco, J. *et al* (1994) 'Brucella ovis infection in two flocks of sheep', *Vet. Record*, 135 (11), pp. 254-256.
- Marín, C. M. *et al* (1989) 'Efficacy of long-acting oxytetracycline alone or in combination with streptomycin for treatment of Brucella ovis infection of rams', *AJVR*, 50 (4), pp. 560-563.
- Moriyón, I. *et al* (2004) 'Rough vaccines in animal brucellosis: Structural and genetic basis and present status', *Vet. Research*, 35 (1), pp. 1-38.
- Picard-Hagen, N. *et al* (2015) 'Contagious epididymitis due to Brucella ovis: relationship between sexual function, serology and bacterial shedding in semen', *BMC Vet. Research*, 11 (1), pp. 125.
- Plommet, M. *et al* (1973) 'Experimental bovine brucellosis. XII. Persistence to adult age of congenital infection in the heifer', *Ann. Rech. Vet.*, 4 (3), pp. 419-435.
- Silva, A. P. *et al.* (2015a) 'Encapsulated Brucella ovis Lacking a Putative ATP-Binding Cassette Transporter (DeltaabcBA) Protects against Wild Type Brucella ovis in Rams', *PLoS One*, 10 (8), pp. e0136865.
- Silva, A. P. *et al.* (2015b) 'Protection of an encapsulated live attenuated strain of Brucella ovis (DeltaabcBA) against experimental challenge in the murine model', *Clin. Vaccine Immunol.*
- Whittington, R. J. *et al.* (1996) 'Antigenic cross-reactions between the causative agent of ovine footrot, *Dichelobacter nodosus*, and other bacteria', *Small Ruminant Research*, 22 (1), pp. 55-57.