

## EPIDIDIMITIS OVINA (*Brucella ovis*)

---

### RESUMEN

*Brucella ovis* produce una enfermedad clínica o subclínica en el ganado ovino que se caracteriza por lesiones genitales y reducción de la fertilidad en los carneros, placentitis y abortos en las ovejas, y aumento de la mortalidad perinatal en los corderos. La enfermedad se ha descrito en países de América y de Europa, así como en Australia, Nueva Zelanda y Sudáfrica, aunque probablemente tenga lugar en la mayoría de los países con producción ovina.

**Identificación del agente:** La existencia de lesiones clínicas (epididimitis u orquiepididimitis) en los carneros puede ser indicativa de la existencia de la infección, aunque se necesitan pruebas de laboratorio para confirmar el diagnóstico. La confirmación de laboratorio puede basarse en métodos directos o indirectos. El diagnóstico directo se realiza por medio del aislamiento bacteriológico de *B. ovis* a partir de muestras de esperma o tejidos de los carneros, o de secreciones vaginales, leche o tejidos de ovejas en medios selectivos adecuados. Se han desarrollado métodos moleculares para la detección complementaria basada en secuencias genómicas específicas. Los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) pueden constituir otra forma de detección. No obstante, para el diagnóstico sistemático son preferibles los métodos indirectos basados en pruebas serológicas.

**Pruebas serológicas:** Para el diagnóstico se debe utilizar la técnica de fijación de complemento (CF), la prueba de inmunodifusión en gel de agarosa (AGID), o el ensayo de inmunofluorescencia indirecta (ELISA), empleando antígenos de superficie solubles obtenidos a partir de la cepa de *B. ovis* REO 198. La sensibilidad de las pruebas AGID e I-ELISA es parecida, y a veces parecen superiores a la de la CF. En cuestión de sensibilidad, una combinación de las técnicas AGID e I-ELISA parece ofrecer los mejores resultados. Sin embargo, respecto al coste y la simplicidad, la prueba AGID es la más factible para el diagnóstico de *B. ovis* en laboratorios no especializados. No obstante, dada la inexistencia de métodos estandarizados reconocidos internacionalmente para el I-ELISA y el AGID, la prueba más idónea para certificar animales individuales antes de su traslado, incluso para el comercio internacional, continúa siendo la CF.

**Requisitos para las vacunas:** Los cultivos del inóculo para la producción de vacunas deben obtenerse a partir de los laboratorios reconocidos internacionalmente. Para la prevención de la infección de los carneros por *B. ovis*, puede utilizarse de manera segura y eficaz una dosis única estándar de vacuna viva de *B. melitensis* Rev.1 administrada por vía subcutánea o, mejor, por vía conjuntival. Esta cepa de vacuna debe cumplir los estándares mínimos de calidad: una concentración suficiente, ausencia de disociación, una suficiente virulencia residual e inmunogenicidad (eficacia), y ausencia de otros agentes (véase el Capítulo 3.1.4 Brucelosis [*Brucella abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*]).

### A. INTRODUCCIÓN

#### 1. Definición de la enfermedad

*Brucella ovis* causa una infección peculiar en el ganado ovino y es una de las causas más frecuentes de epididimitis en corderos; también causa infertilidad y abortos en las ovejas, aunque de manera poco frecuente, y aumento en la mortalidad de los corderos.

## 2. Agente etiológico

*Brucella ovis* y *B. canis* son las dos especies de *Brucella* actualmente conocidas que de manera natural se encuentran en la fase rugosa. *Brucella ovis* es similar a las otras especies de *Brucella* en cuanto a morfología, a propiedades de tinción y a las características de los cultivos, excepto por el hecho de que da reacciones negativas en las pruebas de la oxidasa y de la ureasa. Las propiedades microbiológicas y serológicas del género *Brucella* y de las especies y biotipos relacionados se indican en el Capítulo 3.1.4 Brucelosis (*Brucella abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*).

## 3. Descripción de la enfermedad

*Brucella ovis* infecta al ganado ovino causando lesiones genitales (epididimitis y orquiepididimitis) e infertilidad en los carneros, placentitis, abortos e infertilidad en las ovejas y un aumento de la mortalidad perinatal en los corderos. *Brucella ovis* suele excretarse con el esperma de los carneros infectados. La transmisión venérea pasiva a través de la oveja parece ser la vía de infección más frecuente, aunque también es muy frecuente la transmisión entre carneros (Blasco, 1990; 2010). En los sistemas de producción semiextensivos (más frecuentes en los países europeos mediterráneos), los carneros suelen alojarse juntos. Por lo tanto, la transmisión directa entre carneros durante los periodos no reproductivos es bastante frecuente y se ha sugerido que tiene lugar mediante varias vías, como la monta anal y, con mayor frecuencia, a través de contacto oro-genital (lamido de prepucio).

Por otra parte, las ovejas infectadas pueden excretar *B. ovis* con las secreciones vaginales y la leche y, por lo tanto, la transmisión de oveja a carnero y de oveja en lactación a cordero también podrían ser mecanismos de infección importantes. Así, las ovejas deben considerarse relevantes en la epidemiología de esta infección, y ello debe tenerse en cuenta para erradicar de forma efectiva *B. ovis* de los rebaños infectados (Blasco, 2010; Grilló *et al.*, 1999).

Esta enfermedad se ha documentado en países de América y de Europa, así como en Australia, Nueva Zelanda y Sudáfrica, pero probablemente tenga lugar en la mayoría de países con producción ovina.

La demostración de la existencia de lesiones genitales (epididimitis unilateral o bilateral, y orquiepididimitis) mediante la palpación de los testículos de los carneros puede ser un indicio de la presencia de esta infección en un determinado rebaño. Sin embargo, este diagnóstico clínico no es suficientemente sensible porque no todos los carneros infectados por *B. bovis* presentan lesiones genitales palpables (Blasco, 1990). Además, el diagnóstico clínico carece de especificidad debido a la existencia de muchas otras bacterias que causan lesiones genitales en los carneros. Los agentes patógenos que más frecuentemente causan este tipo de lesiones en los carneros son *Actinobacillus seminis*, *A. actinomycetenumcomitans*, *Histophilus ovis*, *Haemophilus* spp., *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis*, *B. Melitensis*, *Chlamydia abortus* y *Pasteurella* spp. (Bulgin & Anderson, 1983; García-Pastor *et al.*, 2009; Livingstone & Hardy, 1964). Debe hacerse hincapié en que muchas lesiones testiculares palpables de los carneros son granulomas espermáticos estériles provocados por un traumatismo.

Aunque se ha comprobado que el ganado vacuno, las cabras y los ciervos son susceptibles a *B. ovis* en experimentos de transmisión artificial, solo se han descrito casos naturales en ciervos criados en contacto directo con carneros infectados (Ridler *et al.*, 2012).

## 4. Riesgo zoonótico y requisitos de bioseguridad

Hasta la fecha, no se ha documentado ningún caso humano, y *B. ovis* se considera no zoonótica. No obstante, en zonas en las que la infección por *B. melitensis* coexiste con la infección por *B. ovis*, debe tenerse especial cuidado al manipular muestras, que deberán transportarse al laboratorio en recipientes herméticos (para más información, consúltese el Capítulo 3.1.4 Brucelosis [*Brucella abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*] y el Capítulo 1.1.3 Transporte de material biológico). Todas las manipulaciones de laboratorio con cultivos vivos o material que pueda estar infectado o contaminado deben llevarse a cabo a un nivel de bioseguridad y contención adecuado, que se determinará a partir de un análisis del riesgo biológico (Capítulo 1.1.4 Bioseguridad y bioprotección: norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales).

## B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

**Tabla 1.** Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la epididimitis ovina y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos <sup>a</sup>	Contribuir a las políticas de erradicación <sup>b</sup>	Confirmar casos clínicos <sup>c</sup>	Confirmar casos sospechosos <sup>d</sup>	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia
<b>Identificación del agente<sup>1</sup></b>						
Métodos de tinción	–	–	–	+	–	–
Cultivo	–	–	–	+++	+/ <sup>d</sup> +++	–
PCR <sup>e</sup>	–	–	–	+/ <sup>d</sup> +++	+/ <sup>d</sup> +++	–
<b>Detección de respuesta inmunitaria</b>						
CF	+++	+++	+++	++	++	++
I-ELISA	+++	+++	+++	++	++	+++
AGID	++	++	+++	++	++	++

Clave: +++ = método recomendado; ++ = método idóneo; + = puede utilizarse en algunas situaciones, pero el coste, la fiabilidad y otros factores limitan mucho su aplicación; – = no adecuado para este propósito; n/a = no aplicable. Aunque no todas las pruebas clasificadas como +++ o ++ han sido validadas formalmente, su uso sistemático y el hecho de que se hayan utilizado ampliamente sin resultados dudosos las hace aceptables.

PCR = reacción en cadena de la polimerasa; CF = fijación del complemento;

I-ELISA = enzimoanálisis indirecto; AGID = inmunodifusión en gel de agar.

<sup>a</sup>Solo es aplicable a rebaños/manadas, países o zonas libres de infección por *Brucella ovnis*.

<sup>b</sup>Para mejorar la eficiencia de las políticas de erradicación en rebaños/manadas infectados, se recomienda combinar pruebas para aumentar la sensibilidad del diagnóstico, es decir, realizar al menos dos pruebas serológicas, como una CR (o AGID) y un I-ELISA;

<sup>c</sup>En las zonas de prevalencia baja o casi libres, el valor predictivo de un resultado positivo en pruebas serológicas puede ser muy bajo. En tales circunstancias, para confirmar los casos clínicos suele ser necesaria la detección del agente patógeno. En rebaños/manadas infectadas, un resultado positivo en cualquier prueba serológica se puede considerar como confirmación de un caso clínico.

<sup>d</sup>En los rebaños/manadas infectados, toda reacción en cualquier prueba serológica debe considerarse evidencia de infección. En las zonas de prevalencia baja o casi libres, los casos aislados de reacción a pruebas serológicas pueden confirmarse mediante cultivo (y/o PCR). En los países o zonas libres, los animales sospechosos son aquellos que dan un resultado positivo tanto en una prueba serológica de cribado como en una de confirmación (pruebas seriadas, por ejemplo I-ELISA y CF, respectivamente) y deben confirmarse mediante cultivo (y/o PCR).

<sup>e</sup>Pueden tener lugar falsos positivos.

### 1. Identificación del agente etiológico

#### 1.1. Obtención de muestras

Las muestras más valiosas para el aislamiento de *B. ovnis* a partir de animales vivos son el esperma, los hisopos vaginales y la leche. Para la obtención de los hisopos vaginales y de la leche, véanse las instrucciones que se dan en el capítulo 3.1.4. El esperma (líquidos genitales) se puede obtener fácilmente con hisopos tomados de la cavidad prepucial después de la electroeyaculación. Dichos hisopos también se pueden tomar directamente de la vagina de ovejas libres de brucelosis inmediatamente después de la monta natural por un carnero en el que se sospeche de infección. Los carneros infectados, presenten o no signos clínicos, pueden excretar *B. ovnis* de forma intermitente con el esperma durante años (Blasco, 2010). Los hisopos vaginales que se toman después de un aborto o

1 Se recomienda aplicar una combinación de métodos de detección del agente etiológico a la misma muestra clínica.

parto prematuro y las muestras de leche son muestras muy recomendables para aislar *B. ovvis* de ovejas infectadas (Grilló *et al.*, 1999).

Para el aislamiento de *B. ovvis* después de la necropsia, los órganos preferidos en cuanto a la probabilidad de aislamiento son el epidídimo, la vesícula seminal, las ampollas de los conductos deferentes y los ganglios linfáticos inguinales de los carneros, así como el útero y los ganglios linfáticos ilíacos y supramamarios en las ovejas. Sin embargo, para obtener una sensibilidad máxima, se debe realizar una búsqueda completa que incluya otros órganos y ganglios linfáticos (esplénicos, craneales, escapulares, prefemorales y testiculares) (Blasco, 2010). También se pueden examinar los corderos muertos y las placentas. Los sitios preferidos para el aislamiento a partir de corderos abortados o nacidos muertos son el contenido del abomaso y el pulmón.

Las muestras para el cultivo deben refrigerarse y transportarse al laboratorio para ser cultivadas lo antes posible después de la obtención. El microorganismo permanece viable durante 48–72 horas a temperatura ambiente, pero si el cultivo va a retrasarse, la supervivencia se mejora refrigerando o, preferiblemente, congelando muestras tisulares.

## 1.2. Métodos de tinción

Se pueden examinar hisopos vaginales o de esperma de animales con signos clínicos mediante la tinción por el método de Stamp (Alton *et al.*, 1988) (véase el Capítulo 3.1.4.), y en muchos de los animales infectados pueden resultar visibles coccobacilos característicos. El examen de frotis de tejidos sospechosos teñidos por el método de Stamp (el tracto genital y los ganglios linfáticos inguinales de los carneros; las placentas de las ovejas y el contenido del abomaso y el pulmón de los fetos) también puede servir para un diagnóstico provisional rápido.

Sin embargo, en tales muestras también se pueden encontrar otras bacterias con morfología o características de tinción similares (*B. melitensis*, *Coxiella burnetii* y *Chlamydia abortus*), haciendo difícil el diagnóstico para el personal con poca experiencia. Por ello, los resultados microscópicos siempre deben confirmarse mediante el cultivo del microorganismo.

## 1.3. Cultivo

Debido a su especificidad, el mejor método directo de diagnóstico es el aislamiento y la identificación de *B. ovvis* en líquidos y tejidos de ganado ovino y, si es posible, la única forma de demostrar de manera incontestable la infección por *B. ovvis* en un animal o rebaño determinado. Las muestras de esperma, los hisopos vaginales, o la leche se pueden extender directamente en placas con el medio de cultivo adecuado e incubarse a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  en una atmósfera con  $\text{CO}_2$  al 5–10%. Antes de sembrarlo, los tejidos deben macerarse y triturarse con un homogeneizador o una licuadora añadiendo una pequeña cantidad de suero fisiológico o solución salina tamponada con fosfato (PBS). Es importante tener en cuenta que cuanto mayor sea la cantidad de homogenados de tejido y mayor sea el número de placas de cultivo inoculadas por muestra, mayor será la sensibilidad diagnóstica final que se obtenga.

El crecimiento aparece tras 3–4 días de incubación, pero los cultivos no deben descartarse como negativos hasta que hayan transcurrido 7 días. Las colonias de *B. ovvis* se hacen visibles (0,5–2,5 mm) después de 3 o 4 días de incubación, y están en fase rugosa y son redondeadas, brillantes y convexas.

*Brucella ovvis* puede ser aislada en medios no selectivos, tales como el agar-sangre base enriquecido con suero ovino o bovino estéril al 10%, o en medio de agar-sangre con un 5–10% de sangre ovina estéril. Sin embargo, dado que el inóculo primario requiere 4–7 días de incubación, el sobrecrecimiento de hongos y de bacterias comensales y ambientales a menudo contamina las placas de los cultivos no selectivos, y da lugar a una reducción de la sensibilidad diagnóstica. Por consiguiente, el uso de medios selectivos es fundamental para el diagnóstico bacteriológico de una infección por *B. ovvis*.

El medio selectivo de Farrell modificado que se emplea mucho para el aislamiento de *Brucella* en fase lisa (véase el Capítulo 3.1.4) inhibe el crecimiento de *B. ovvis* y no debe utilizarse (Marin *et al.*, 1996). Se han descrito distintos medios selectivos, pero el de Thayer-Martin modificado (mTM) (Marin *et al.*, 1996) se ha utilizado clásicamente para aislar *B. ovvis*. De forma resumida, este medio se puede preparar con medio base GC (38 g/litro Difco, EE.UU.) suplementado con hemoglobina (10 g/litro) y metanesulfonato de colistina (7,5 mg/litro), vancomicina (4 mg/litro), nitrofurantoina (10 mg/litro), nistatina (100,000 Unidades Internacionales [IU]/litro = 17,7 mg) y anfotericina B (2,5 mg/litro). Las soluciones de trabajo se preparan así:

**Solución A:** Se añaden 500 ml de agua destilada al medio base GC, se calienta la mezcla cuidadosamente para evitar quemar el medio, mientras se agita continuamente y se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

**Solución B:** Se resuspende la hemoglobina en 500 ml de agua destilada, añadiendo el agua lentamente para evitar grumos. Una vez disuelta, se añade una varilla magnética y se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos

**Solución de antibiótico (preparada a diario):** la colistina, la nistatina y la vancomicina se resuspenden en una mezcla de metanol/agua (1/1); la nitrofurantoína se suspende en 1 ml de una solución estéril de NaOH 0,1 M. En el caso de la anfotericina B, se recomienda preparar una solución base de 10 mg/ml de anfotericina B con 10 mg disueltos primero en 1 ml de dimetilsulfóxido estéril (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS, grado analítico) y añadidos después a 9 ml de PBS estéril (10 mM, pH 7,2 ± 0,1). Toda solución base que sobre puede guardarse 5 días a 5°C ± 3°C. Todas las soluciones de antibióticos deben filtrarse a través de filtros de 0,22 µm antes de añadirse al medio de cultivo. Otra combinación de antibióticos, adecuada pero menos efectiva, puede ser la siguiente: vancomicina (3 mg/litro); colistina (7,5 mg/litro); nistatina (12.500 UI/litro); y nitrofurantoína (10 mg/litro).

Tras la esterilización en autoclave, se estabiliza la temperatura (45–50°C) de ambas soluciones, A y B, con agitación continua. Se mezclan ambas soluciones (añadiendo A a B), evitando la formación de burbujas. Se añaden las soluciones de antibióticos mientras se agita continuamente y con cuidado, y el contenido se reparte en placas estériles. Una vez preparadas, las placas no deben guardarse durante demasiado tiempo, y siempre se recomienda trabajara con medio acabado de preparar.

No obstante, el medio mTM no es translúcido debido a que se le añade hemoglobina como componente basal, y por lo tanto es inadecuado para la observación directa de la morfología de las colonias. Ello tiene importantes consecuencias prácticas porque probablemente sea el procedimiento más utilizado para la identificación provisional de *Brucella* (Alton *et al.*, 1988). Teniendo esto en cuenta, recientemente se ha formulado un nuevo medio de cultivo (denominado CITA) empleando base agar sangre como componente basal, y suplementado con un 5% de suero estéril de ternero y los siguientes antibióticos: vancomicina (20 mg/litro), metanesulfonato de colistina (7,5 mg/ litro), nitrofurantoína (10 mg/ litro), nistatina (100 000 IU/ litro), y anfotericina B (4 mg/ litro). Esta mezcla de antibióticos se puede preparar como se ha indicado anteriormente para elaborar el medio mTM. Este nuevo medio, CITA, inhibe la mayor parte de microorganismos contaminantes, pero permite el crecimiento de las especies de *Brucella*. Además, el medio CITA tiene mejor rendimiento que el mTM para el aislamiento de *B. ovis*, y es más sensible que el mTM y que el de Farrell para el aislamiento de especies de *Brucella* en fase lisa a partir de muestras de campo, motivo por el que se considera el medio selectivo de elección para el aislamiento general de *Brucella* (De Miguel *et al.*, 2011).

Todos los medios de cultivo deben someterse a un control de calidad cepas de referencia para asegurar que permiten su crecimiento.

#### 1.4. Identificación y tipificación

Las colonias de *Brucella ovis* no son hemolíticas. Son circulares, convexos, tienen bordes continuos, son siempre de tipo tosco cuando se examinan mediante iluminación oblicua y dan positivo en la prueba de acriflavina (Alton *et al.*, 1988). Para crecer, *B. ovis* necesita una atmósfera enriquecida con un 5–10% de CO<sub>2</sub>. *Brucella ovis* carece de actividad ureásica, no reduce nitratos a nitritos, es catalasa positivo y oxidasa negativo, no produce H<sub>2</sub>S y, aunque no crece en presencia de violeta de metilo, generalmente sí crece en presencia de concentraciones estándar de tionina. Los cultivos no se lisan por la dilución corriente de prueba (RTD), o 10<sup>4</sup> RTD, de los fagos de *Brucella* de los grupos Tbilissi (Tb), Weybridge (Wb) e Izatnagar (Iz), mientras que se lisan por el fago R/C (Alton *et al.*, 1988). La mayoría de los laboratorios no están equipados para una identificación completa de *Brucella* a nivel de especie y de biotipo, y es necesario un programa práctico para la identificación provisional. La mayoría de las cepas de *B. ovis* pueden identificarse correctamente por sus características de crecimiento, la observación directa empleando luz reflejada indirecta, la tinción de Gram o Stamp, y las pruebas de la catalasa, oxidasa, ureasa y acriflavina. Sin embargo, la identificación definitiva debe ser llevada a cabo por laboratorios de referencia con experiencia en la identificación y tipificación de *Brucella*.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y otros métodos moleculares desarrollados recientemente constituyen otro medio de detección e identificación de *Brucella* sp. (véase el Capítulo 3.1.4.) y se están empezando a utilizar de forma sistemática en muchos laboratorios de diagnóstico. La existencia de muestras de esperma intensamente contaminadas por sobrecrecimiento de microorganismos o que contengan *B. ovis* muerta también podría justificar el uso de PCR como prueba complementaria de diagnóstico directo. De hecho, se ha observado que varias PCR tienen una sensibilidad similar al cultivo bacteriológico estándar cuando se aplican a muestras de esperma de

carneros infectados por *B. ovis* (Xavier *et al.*, 2010). No obstante, todavía no se ha determinado bien cuál es la sensibilidad y la especificidad de estas pruebas de diagnóstico directo basadas en la PCR en otras muestras clínicas y, por el momento, la bacteriología clásica debe considerarse el método de elección para el diagnóstico bacteriológico de *B. ovis*. En cambio, el uso de las PCR múltiples con escala de Bruce (véase el Capítulo 3.1.4) con muestras de ADN extraído de colonias de placas e cultivo es un método rápido y muy específico que permite una correcta identificación de la mayoría de especies de *Brucella*, incluida *B. ovis*.

## 2. Pruebas serológicas

Las pruebas más eficaces y utilizadas son la de fijación de complemento (CF), la prueba de doble inmunodifusión en gel de agarosa (AGID) y el ensayo inmunoenzimático indirecto (I-ELISA). Varios países han adoptado varias técnicas diagnósticas estándar para *B. ovis*, pero la prueba más idónea para certificar animales individuales antes de su traslado, incluso para el comercio internacional, reconocido por la OIE y la Unión Europea es la CF. Sin embargo, se ha demostrado que la AGID muestra una sensibilidad parecida a la de la CF, y que es una prueba más fácil de realizar. Aunque se carece de una estandarización a nivel internacional, numerosos estudios independientes de validación han mostrado que el I-ELISA es más sensible que la CF o la AGID. El AGID y el I-ELISA se ha observado que son más sensibles que la CF. En cambio, en ocasiones se ha observado que el I-ELISA es menos específico, pero es algo que en gran medida depende del protocolo que se utilice (Estein *et al.*, 2002; Nielsen *et al.*, 2004; Praud *et al.*, 2012).

El Suero Estándar Internacional anti-*Brucella ovis* (ISaBoS, International Standard 1985<sup>2</sup>) es la referencia utilizada para comparar y calibrar el resto de los estándares. Este estándar de referencia está disponible para los laboratorios de referencia nacionales y debe utilizarse para establecer los estándares secundarios o nacionales frente a los cuales puedan prepararse los estándares de trabajo que se utilizarán en el laboratorio de diagnóstico de forma sistemática en el día a día.

Los antígenos HS que se utilicen en las pruebas serológicas deben prepararse a partir de la cepa REO 198<sup>3</sup> de *Brucella ovis*, que no necesita CO<sub>2</sub> ni suero.

### 2.1. Antígenos

Cuando se extraen células de *Brucella* en fase rugosa con solución salina mediante calor (método salino caliente, HS), se consiguen extractos antigénicos solubles en agua, cuyo componente mayoritario se precipita con sueros frente a *Brucella* rugosa (Diaz & Bosseray, 1973; Myers *et al.*, 1972). Por esta razón los extractos HS han sido denominados como el “antígeno específico de la fase rugosa” o, cuando se obtienen a partir de *B. ovis*, como el “antígeno específico de *B. ovis*”. Sin embargo, la caracterización química de los extractos HS de *B. ovis* ha puesto de manifiesto que estos se encuentran enriquecidos en lipopolisacárido rugoso (R-LPS), en proteínas de la membrana externa del grupo 3, y en otros componentes de la membrana externa (Riezu-Boj *et al.*, 1986). Por tanto, los extractos HS contienen determinantes de LPS específicos para *B. ovis*, pero también componentes antigénicos adicionales, algunos de ellos compartidos con especies rugosas y lisas de *Brucella* (Santos *et al.*, 1984). Tales componentes explican la reactividad cruzada que se observa a veces con el método HS en sueros de ovejas infectadas con *B. melitensis* o vacunadas con *B. melitensis* Rev.1 (Riezu-Boj *et al.*, 1986). El extracto HS es el que actualmente se utiliza más para el diagnóstico serológico de las infecciones por *B. ovis*. La solubilidad en el agua y su alto contenido en epítomos relevantes de la superficie célula explican su buen rendimiento en las pruebas serológicas de detección de *B. ovis*. Sin embargo, en zonas en las que la infección por *B. melitensis* también existe o en que se vacuna al ganado ovino con *B. melitensis* Rev. 1, la especificidad del diagnóstico respecto a *B. ovis* debe interpretarse con cautela, teniendo en cuenta los resultados de las pruebas serológicas de detección de especies lisas de *Brucella* (Blasco, 2010).

Los medios sólidos basales no selectivos descritos en el apartado B.1.3. son adecuados para el crecimiento de *B. ovis* REO 198.

#### 2.1.1. Preparación del antígeno HS

- i) Se hace crecer exponencialmente la cepa de *B. ovis* REO 198 con uno de los siguientes métodos: durante 48 horas en matraces con caldo de cultivo tripticasa-soja en un incubador orbital a 37°C ± 2°C y a 150 rpm; o en botellas de Roux de agar tripticasa-soja u otro medio adecuado; o bien en un fermentador de tipo lote como se describe para

2 Se puede obtener del Laboratorio de Referencia de la OIE para la Brucelosis del Reino Unido.

3 Se puede obtener del Laboratorio de Referencia de la OIE para la Brucelosis de Francia.

*B. abortus*. La adición de suero al 5% al medio es opcional porque la cepa de *B. ovnis* REO 198 no necesita suero.

- ii) Las células se resuspenden en solución salina al 0,85% o PBS, luego se lavan dos veces en solución salina al 0,85% (12 g de células secas o 30 g de células concentradas húmedas en 150 ml).
- iii) A continuación, la suspensión celular se esteriliza en autoclave a 120°C durante 15–3 minutos.
- iv) Después de enfriar, la suspensión se centrifuga (15.000 **g**, 5°C ± 3°C, 15 minutos) y el líquido sobrenadante se filtra y dializa frente a agua destilada, usando 100 veces el volumen de la suspensión, a 4°C; el agua debe cambiarse tres veces durante al menos días.
- v) El líquido dializado se ultracentrifuga (100.000 **g**, 4°C, 6–8 horas) y el sedimento se resuspende en un pequeño volumen de agua destilada y se liofiliza. Cuando se produzca para ser utilizado en la CF, añadir suero de reemplazo II (CPSRII) para el proceso de control antes del liofilizado puede ayudar en la estabilidad y en la actividad anti-complementaria.

A continuación, el HS se resuspende en agua destilada (para su uso en la AGID), en solución salina tamponada con veronal (para su uso en la CF), o en tampón carbonato/bicarbonato (para su uso en el I-ELISA), y se titula en función del método utilizado.

Si va a utilizarse en la AGID, el HS re-suspendido puede mantenerse a 5°C ± 3°C añadiendo opcionalmente fenol al 0,5% como conservante. Se debe evitar la congelación y descongelación de las suspensiones de antígeno (Diaz & Bosseray, 1973).

El antígeno de la CF debe estandarizarse respecto al ISaBoS para dar una fijación del 50% a una dilución del suero de 1/100. Debe recordarse que cada lote de antígeno de la CF debe titularse con la técnica de CF que vaya a seguirse para la prueba ordinaria. Por lo tanto, antes de utilizar un antígeno de CF (comercial o interno) en una CF concreta, el laboratorio debe asegurarse de que el título antigénico se haya establecido con dicha técnica de CF.

En ausencia de unas normas de estandarización establecidas, los antígenos del I-ELISA y del AGID deben titularse respecto a un conjunto de sueros positivos y negativos adecuados.

### 2.1.2. Estandarización del I-ELISA

En un trabajo reciente en el que se ha validado el I-ELISA por comparación con la CF, se han utilizado los siguientes criterios de estandarización del I-ELISA (Praud *et al.*, 2012):

- i) Una pre-dilución a 1/62 del ISaBoS preparada en un suero negativo (o en un conjunto de sueros negativos) debe dar una reacción positiva;
- ii) Una pre-dilución a 1/256 del ISaBoS preparada en un suero negativo (o en un conjunto de sueros negativos) debe dar una reacción negativa.

Estos criterios tendrán que validarse mediante un ensayo interlaboratorial.

En cualquier caso, los kits de I-ELISA, comerciales o internos, deben validarse con arreglo al Capítulo 1.1.6 *Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas*.

## 2.2. Prueba de fijación del complemento

No existe un método estandarizado para la CF, y por lo tanto se recomienda utilizar un suero Estándar Internacional (véase el apartado B.2.2.2). Es mejor realizar la técnica por el método de la microtitulación. Algunos trabajos indican que la fijación fría es más sensible que la fijación caliente (Ris *et al.*, 1984), pero que es menos específica. Sin embargo, las reacciones anticomplementarias, frecuentes con suero de oveja, son más frecuentes con la fijación fría.

Se han propuesto varios métodos para la CF utilizando diferentes concentraciones de hematíes frescos de oveja (SRBC) (se recomienda normalmente una suspensión al 2–3%), sensibilizados con un volumen igual de suero de conejo anti-SRBC diluido hasta contener varias veces (generalmente de dos a cinco veces) la concentración mínima necesaria para producir un 100% de lisis de los SRBC en presencia de una solución titulada de complemento de cobaya. Esta última se titula

independientemente (en presencia o ausencia de antígeno según el método), para determinar la cantidad de complemento necesaria para producir un 50% o un 100% de lisis de SRBC sensibilizados en una unidad de volumen de una suspensión estandarizada; se definen como la unidad hemolítica 50% o 100% del complemento (C'H<sub>50</sub> o C'H<sub>100</sub>), respectivamente. Generalmente se recomienda titular el complemento antes de cada grupo de pruebas, y para que la determinación del C'H<sub>50</sub> sea óptima se prefiere un macrométodo. Por lo general, en la prueba se utilizan 1,25–2 C'H<sub>100</sub> o 5–6 C'H<sub>50</sub>.

La solución salina tamponada con barbital (veronal) (VBS) es el diluyente estándar para la CF. Se prepara a partir de comprimidos comerciales, de lo contrario, se puede preparar de acuerdo con la fórmula descrita en otro lugar (véase el Capítulo 3.1.4). Los sueros problema deben inactivarse durante 30 minutos en un baño de agua a 60–63°C, y a continuación diluirse (diluciones a la mitad) en VBS. La solución de base del antígeno HS (2,5–20 mg/ml en VBS) se diluye en VBS como se determinó previamente mediante la titulación (titulación en sistema de doble entrada). Normalmente sólo se analiza una dilución de suero (generalmente la 1/10).

### 2.2.1. Procedimiento analítico

Utilizando placas de microtitulación estándar de 96 pocillos con fondo redondo (en U), la técnica normalmente se realiza del siguiente modo:

- i) Se colocan 25 µl del suero problema inactivado en los pocillos de la primera y segunda filas. La primera fila es un control anti-complementario para cada suero. Se añaden volúmenes de 25 µl de VBS a los pocillos de la primera fila (controles anti-complementarios) para compensar la falta de antígeno. Se añaden volúmenes de 25 µl de VBS a todos los demás pocillos excepto a los de la segunda fila. Se preparan diluciones seriadas a la mitad transfiriendo volúmenes de suero de 25 µl de la tercera fila en adelante
- ii) Se añaden a cada pocillo, excepto a los pocillos de la primera fila, volúmenes de 25 µl de antígeno diluido hasta la concentración de trabajo.
- iii) Se añaden a cada pocillo volúmenes de 25 µl de complemento, diluidos hasta el número de unidades requeridas.
- iv) Los pocillos control deben contener 75 µl de volumen total en cada caso; estos pocillos contienen
  - a) solo diluyente,
  - b) complemento + diluyente,
  - c) antígeno + complemento + diluyente.

Los sueros control que den una reacción positiva muy floja deben analizarse en cada conjunto de pruebas para comprobar la sensibilidad de las condiciones analíticas.

- v) Las placas se incuban a 37°C ± 2°C durante 30 minutos, o a 5°C ± 3°C durante toda la noche, y se añade en cada pocillo un volumen (25 o 50 µl, dependiendo de la técnica) de SRBC sensibilizados. Las placas se re-incuban a 37°C ± 2°C durante 30 minutos.
- vi) Se leen los resultados después de haber centrifugado las placas a 1.000 **g** durante 10 minutos a 5°C ± 3°C, o de haberlas dejado reposar a 5°C ± 3°C durante un mínimo de 2–3 horas para permitir que precipiten las células no lisadas. El grado de hemólisis se compara con estándares correspondientes a 0, 25, 50, 75 y 100 % de lisis. El título del suero problema es la dilución más alta a la cual hay un 50% o menos de hemólisis.

### 2.2.2. Estandarización de los resultados de la prueba de fijación del complemento

Existe un sistema de unidades basado en el Estándar Internacional para el Suero anti-*Brucella ovis* (ISaBoS o Estándar Internacional 1985 [véase la nota 3 a pie de página]). Este suero contiene 1.000 ICFTU /ml. Si este suero se analiza con un método determinado y da, por ejemplo, un título de 200, (50% de hemólisis), entonces el factor para un suero desconocido analizado mediante ese método se puede hallar a partir de la fórmula: 1.000/200 x título del suero problema = número de ICFTU (unidades internacionales de CF) de anticuerpo en el suero problema por ml. Es recomendable que en cualquier país en el que se utilice la CF a escala nacional se llegue a un acuerdo, entre los distintos laboratorios que realizan la prueba mediante el mismo método, para garantizar la obtención del mismo nivel de sensibilidad y especificidad frente a un conjunto adecuado de sueros procedentes de ganado ovino cuyos cultivos sean positivos para *B. ovis*, y de ganado ovino libre de *Brucella*. Los resultados deben expresarse siempre en ICFTU, calculados con relación a aquellos obtenidos en una titulación



en paralelo con un suero estándar, que a su vez puede calibrarse frente al Estándar Internacional.

### 2.2.3. Interpretación de los resultados

Los sueros que dan un título equivalente a 50 ICFTU/ml o más se consideran positivos.

## 2.3. Enzimoimmunoanálisis

Se han propuesto diversas variaciones de esta prueba. La prueba que se describe aquí es un ELISA indirecto (I-ELISA) en el que se utiliza ABTS (2,2'-azino-bis-[ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico]) como cromógeno, aunque son también adecuados otros procedimientos, y ahora existen varios kits comerciales.

Las pruebas se realizan en placas de ELISA de 96 pocillos de fondo plano.

Las diluciones de los reactivos y el suero se preparan en PBS, pH 7,2 ( $\pm 0,2$ ), añadiendo Tween 20 al 0,05% (PBST).

Se preparan diluciones del antígeno para la adsorción en un tampón carbonato/bicarbonato, (pH 9,6  $\pm$  0,2). Las placas se lavan después de cubrir con el antígeno y entre incubaciones, cuando es apropiado, normalmente con PBST (véase abajo). El antígeno (HS) y el conjugado se titulan mediante el sistema de doble entrada, y se seleccionan las diluciones que proporcionan el mejor cociente de discriminación entre los sueros estándar positivos y los negativos. Los anticuerpos secundarios (por ejemplo, anticuerpo anti IgG ovina [cadenas H+L]) por lo general se conjugan a peroxidasa de rábano (HRPO), aunque se pueden usar otras enzimas o conjugados (tales como la proteína recombinante G/HRPO). También se ha encontrado un anticuerpo monoclonal frente a IgG<sub>1</sub> bovina conjugado con HRPO que es adecuado para su uso en el I-ELISA (Vigliocco *et al.*, 1997). Si se usa un conjugado a peroxidasa, el cromógeno, normalmente ABTS, se diluye en un tampón sustrato (compuesto de ácido cítrico y citrato sódico, véase abajo)<sup>4</sup>. Se añade el sustrato, peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), al tampón de sustrato y se incuban las placas durante 15–30 minutos a temperatura ambiente (22°C  $\pm$  4°C). La reacción se puede detener con azida sódica 1 mM u otros reactivos, y el cambio de color se lee a 405–414 nm (para más detalles véase el Capítulo 3.1.4).

El antígeno usado en el I-ELISA es el HS en la solución base a 1 mg/ml en tampón de cobertura, titulada en un sistema de doble entrada con diferentes diluciones de antígeno, conjugado y sustrato, frente a un suero estándar o frente a diluciones seriadas de un conjunto de sueros ovinos de cultivos positivos para *B. ovis*, y de un conjunto de sueros ovinos libres de *Brucella*, para determinar la concentración de trabajo más sensible y específica (por lo general 5–10  $\mu$ g/ml). En la literatura se han publicado otros antígenos, sobre todo R-LPS (Nielsen *et al.*, 2004), pero su extracción es complicada y peligrosa, y no tienen ninguna ventaja en particular respecto al HS, que también se utiliza en la CF y en la AGID.

En cada placa debe añadirse un control positivo y uno negativo. Para definir los criterios de validación de los resultados de cada placa, deben establecerse los intervalos de DO que deben obtenerse con estos dos controles. La DO del control positivo es aquella con la que se compararán las DO de los sueros problema para establecer sus resultados (negativo o positivo).

A cada placa debe añadirse otro suero positivo (control interno) para validar la repetibilidad de la prueba entre placas y entre días.

### 2.3.1. Procedimiento analítico (ejemplo)

- i) Se antígenan placas de microtitulación de poliestireno de calidad (es importante obtener resultados constantes puesto que cada marca da unos valores de adsorción) añadiendo a cada pocillo 100  $\mu$ l de una dilución de un antígeno predeterminado de adsorción:

*Tampón de adsorción* (tampón carbonato-bicarbonato 0,06 M, pH 9,6  $\pm$  0,2):

- a) Solución A: 0,84 g de NaHCO<sub>3</sub> en 10 ml de agua destilada.
- b) Solución B: 1,06 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en 10 ml de agua destilada.

Se mezclan 4,53 ml de A con 1,82 ml de B y se añade agua destilada hasta los 100 ml.

4 TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) También es un sustrato cromógeno conocido para la detección de HRP en el ELISA y se vende en varios formatos. No es carcinógeno.

Las placas, selladas, se incuban a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche, preferiblemente. A continuación, se lavan cuatro veces con el tampón de lavado para eliminar el antígeno no unido y se secan golpeándolas firmemente con la cara superior hacia abajo sobre papel absorbente.

*Tampón de lavado* (PBS 0,01 M, pH  $7,2 \pm 0,2$ , que contenga Tween 20 al 0,05%):

a) Solución base:

Solución A:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ : 10,96 g en 150 ml de agua destilada

Solución B:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ( $\text{H}_2\text{O}$ ): 3,15 g en 150 ml de agua destilada (3,5 g en 150 ml de agua destilada si se utiliza  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2(\text{H}_2\text{O})$ )

b) Se mezclan A y B y se añade agua destilada hasta los 400 ml.

c) Tampón de lavado (PBST): 40 ml de la solución base + 8,5 g de NaCl y agua destilada hasta los 1 000 ml, añadiendo Tween 20 al 0,05%.

Las placas antigenadas y lavadas se pueden utilizar de inmediato o secarse y guardarse a  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  (la estabilidad en estas condiciones suele ser suficiente durante al menos 1 mes). La mayor parte de lotes de HS rinden adecuadamente cuando se utilizan a concentraciones de trabajo de 2,5–15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en tampón de adsorción.

- ii) *Sueros*: Se diluyen muestras del suero problema y de los controles positivo y negativo (1/100–1/200 suelen ser las diluciones de trabajo óptimas, y se preparan añadiendo 10  $\mu\text{l}$  de suero a 1–2 ml de PBST, respectivamente). Estas diluciones de trabajo normalmente son las óptimas cuando se utilizan conjugados anti-IgG. Sin embargo, diluciones de trabajo más bajas (normalmente de 1/50) son las óptimas cuando se utilizan conjugados de proteína G-HRPO (Marin *et al.*, 1998). Se añaden por duplicado volúmenes de muestra de 100  $\mu\text{l}/\text{pocillo}$  a las placas de microtitulación. Las placas se cubren o sellan, se incuban a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 40–60 minutos y se lavan tres veces con el tampón de lavado PBST.
- iii) *Conjugado*: La dilución de trabajo óptima del conjugado titulado (el más utilizado es la proteína G o anticuerpo de conejo anti IgG ovina (H+L), ambos unidos a HRPO) en PBST se añade (100  $\mu\text{l}$ ) a los pocillos, y las placas se cubren y se incuban durante 40–60 minutos a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Tras la incubación, las placas se lavan de nuevo tres veces con PBST.
- iv) *Sustrato*: Existen varias posibilidades, pero el sustrato más utilizado<sup>5</sup> suele estar formado por una solución al 0,1% (p/v) de ABTS (2,2'-azino-bis-[ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico, sal de diamonio) en tampón citrato con  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 0,004%):

*Tampón citrato* (0,05 M, pH  $4 \pm 0,2$ ):

a) Solución A: 22,97 g de ácido cítrico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) en 1000 ml de agua destilada.

b) Solución B: 29,41 g de citrato sódico ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) en 1000 ml de agua destilada.

Se mezclan 660 ml de A con 470 ml de B y se añade agua destilada hasta los 2000 ml. A continuación, se añade un 0,004% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de grado alto y nuevo.

La solución sustrato se añade (100  $\mu\text{l}/\text{pocillo}$ ) y las placas se incuban durante 15–30 minutos a temperatura ambiente con agitación continua.

- v) *Lectura e interpretación de los resultados*: La absorbancia se lee automáticamente en un espectrofotómetro a 405–414 nm. Los valores de absorbancia media se pueden expresar como porcentajes de la absorbancia media del control positivo, o preferiblemente, transformarse en unidades de I-ELISA calculadas bien manualmente, o utilizando un ordenador y un programa de aproximación de curva a partir de una curva estándar construida con los resultados de las series de las diluciones del control positivo. Las lecturas duplicadas de cada suero deben ser similares. En caso de discrepancia importante, el suero en cuestión deberá volver a analizarse. Antes de calcular los resultados finales, cada placa debe validarse teniendo en cuenta los valores de OD que se

5 TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) también es un sustrato cromógeno conocido para la detección de HRP en el ELISA y se vende en varios formatos. No es carcinógeno

hayan obtenido con los controles positivo y negativo así como las OD transformadas del control interno según los intervalos de valores esperables pre-establecidos.

Debe establecerse de forma adecuada el umbral de corte utilizando las técnicas de validación apropiadas (véase el capítulo 1.1.6) y evitando, en la medida de lo posible, umbrales que den lugar a resultados inconcluyentes. Debe utilizarse el ISaBoS o los correspondientes estándares secundario o nacional para verificar o calibrar el método analítico en cuestión como se menciona arriba.

## 2.4. Inmunodifusión en gel de agar

En la AGID (Blasco, 1990) se utilizan los siguientes reactivos: agar o agarosa Noble de grado alto, cloruro de sodio (NaCl) y tampón borato (preparado con ácido bórico [12,4 g]; cloruro de potasio [14,5 g]; agua destilada [1600 ml]; ajustado a pH 8,3 ± 0,02 con solución de NaOH 0,2 M agua destilada hasta los 2000 ml).

### 2.4.1. Preparación del gel de agar

Se disuelve 1g de agarosa (o agar Noble) y 10 g de NaCl en 100 ml de tampón borato (hirviendo mientras se agita continuamente).

Se cubren los portaobjetos, limpios, colocados sobre una superficie plana, con la cantidad necesaria del gel fundido para formar un lecho de 2,5 mm de espesor (aproximadamente 3,5 ml en el caso de los portaobjetos estándar).

Después de que el gel se haya solidificado (15–20 minutos), se recortan los pocillos utilizando un punzón para geles.

Los pocillos deberán ser de 3 mm de diámetro y estar separados 3 mm entre ellos, y estar dispuestos según un patrón hexagonal alrededor de un pocillo central que también tendrá 3 mm de diámetro.

La prueba se puede adaptar a las placas de Petri o a otros sistemas.

### 2.4.2. Procedimiento analítico

Los sueros a examinar se colocan en pocillos alternos separados por un suero control positivo (infección demostrada mediante bacteriología), con el antígeno a su concentración óptima en el pocillo central.

Los resultados se leen después de una incubación durante 24 y 48 horas a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Una reacción positiva se manifiesta por la presencia de una línea claramente definida de precipitado entre el pocillo central y los pocillos de los sueros problema que sea total o parcialmente idéntica a la de los controles positivos.

También pueden aparecer líneas de precipitado que no den una identidad total y que pueden corresponder a componentes antigénicos minoritarios de los extractos HS (en las infecciones debidas a *B. melitensis* o en caso de vacunación con Rev. 1 también pueden generarse con frecuencia anticuerpos frente a estos componentes). Estas reacciones también deben considerarse como positivas. Antes de llegar a una conclusión definitiva, es importante lavar los portas durante 1 hora en una solución de citrato sódico al 5% en agua destilada para eliminar las líneas de precipitina inespecíficas.

El antígeno más usado en la AGID es el HS (2,5–20 mg/ml) diluido en agua destilada, que opcionalmente puede contener fenol al 0,5% como conservante (este antígeno conservado se puede guardar refrigerado durante al menos 1 mes). Las diluciones del antígeno se analizan con un conjunto de 20–30 sueros de carneros infectados de forma natural con *B. ovis* y con un conjunto de sueros de animales libres de *Brucella*. La concentración antigénica de trabajo óptima es aquella que da la línea de precipitación más clara con todos los sueros de los carneros infectados por *B. ovis*, y que da negativo con los sueros de los animales libres de *Brucella*.

En estudios comparativos se ha comprobado que el I-ELISA tiene una mejor sensibilidad que la AGID o la CF (Blasco, 2010; Gall *et al.*, 2003; Praud *et al.*, 2012; Ris *et al.*, 1984). No obstante, debido a la existencia de ciertos sueros que dan negativo con I-ELISA pero positivo con AGID (o CF) y viceversa, la combinación de AGID (o CF) e I-ELISA suele dar lugar a una sensibilidad

óptima y puede resultar útil en los programas de erradicación en zonas o rebaños infectados (Blasco, 2010; Praud *et al.*, 2012).

Además, la CF tiene otros inconvenientes importantes, como la complejidad, la obligatoriedad de inactivar el suero, la actividad anticomplementaria de ciertos sueros, la dificultad de realizarla con sueros hemolizados y los fenómenos prozona. Por lo tanto, dada su sensibilidad, simplicidad y facilidad de interpretación, tanto el I-ELISA como el AGID son las pruebas de elección para la vigilancia en zonas libres o casi libres.

Se sabe poco acerca de la existencia falsos positivos en las pruebas serológicas de detección de *B. ovis* debidos a infecciones por bacterias con epítomos que reaccionen de forma cruzada con *B. ovis*. El agente causal del pederero ovino (*Dichelobacter nodosus*) se ha descrito como responsable de reacciones serológicas cruzadas con *B. ovis*, pero no se conoce bien ni el alcance ni las consecuencias en la práctica de esta reactividad cruzada en las pruebas de diagnóstico de *B. ovis*. Además, *Arcanobacterium pyogenes* y *Corynebacterium ovis*, cuyos extractos solubles reaccionan de forma cruzada con sueros de carneros infectados por *B. ovis*, se han aislado de varios ganglios linfáticos de carneros que han dado respuestas fuertemente positivas tanto en la AGID como en el I-ELISA de detección de *B. ovis* (Blasco, 2010; Blasco & Moriyon, resultados no publicados).

### C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

Dado que tanto carneros como ovejas pueden intervenir en la transmisión de la infección (Blasco, 2010; Grilló *et al.*, 1999), vacunar tanto a carneros como a ovejas probablemente sea la forma más económica y práctica de controlar *B. ovis* a medio plazo en zonas con una alta prevalencia de la infección. Para el control a largo plazo, debe plantearse el efecto de la vacunación en las pruebas serológicas, y la posible complicación de implementar programas de acreditación de la ausencia de *B. ovis*.

No existe ninguna vacuna específica contra *B. ovis*, pero una cepa Rev.1 viva de *B. melitensis* (que se describe en el Capítulo 3.1.4, incluidos los requisitos de calidad) también es adecuada para estimular la inmunidad contra la infección por *B. ovis* (Blasco, 1990). Una dosis estándar única ( $10^9$  unidades formadoras de colonia) de Rev.1 administrada por vía subcutánea (en un volumen de 1 ml) o, mejor, por vía conjuntiva (en un volumen de 25–30  $\mu$ l) a animales de 3-5 meses confiere inmunidad suficiente contra *B. ovis*. La vacunación por vía conjuntiva tiene la ventaja de minimizar la intensidad y la larga duración de la respuesta serológica que desencadena la vacunación por vía subcutánea, mejorando así la especificidad de las pruebas serológicas (Blasco, 1990), y facilitando la interpretación de los resultados serológicos tras la vacunación. Tanto en machos jóvenes como en adultos, se ha observado que la vacuna con Rev.1 es inocua y que muy raramente ocasiona efectos secundarios (Marin *et al.*, 1990; Muñoz *et al.*, 2008). Por lo tanto, en países con una producción ovina extensiva y niveles altos de prevalencia, sería aconsejable vacunar tanto a animales jóvenes como adultos sanos (véase el Capítulo 3.1.4). En los países afectados por *B. ovis* pero libres de *B. melitensis*, antes de utilizar la vacuna con Rev.1 debe tenerse en cuenta la posibilidad de interferencias serológicas, y para minimizar este problema debe escogerse preferiblemente la vía conjuntiva.

En cuanto a la vacuna con *B. abortus* RB51, no se ha comprobado que funcione contra *B. ovis* en ganado ovino (Jiménez De Bagües *et al.*, 1995), y a pesar de los prometedores resultados que se han obtenido con vacunas subcelulares de nueva generación (Cassataro *et al.*, 2007; Da Costa Martins *et al.*, 2010; Muñoz *et al.*, 2006), todavía no se ha autorizado ninguna para ser utilizada en condiciones de campo.

### BIBLIOGRAFÍA

ALTON G.G., JONES L.M., ANGUS R.D. & VERGER J.M. (1988). Techniques for the Brucellosis Laboratory. INRA, Paris, France.

BLASCO J.M. (1990). *Brucella ovis*. In: Animal Brucellosis, Nielsen K. & Duncan J.R., eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 351–378.

BLASCO J.M. (2010). *Brucella ovis* infection. In: Infectious and Parasitic Diseases of Livestock, Lefèvre P.C., Blancou J., Chermette R. & Uilenberg G., eds. Lavoisier, Paris, France. Vol. 2:1047–1063.

BULGIN M.S. & ANDERSON B.C. (1983). Association of sexual experience with isolation of various bacteria in cases of ovine epididymitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **182**, 372–374.

- CASSATARO J., PASQUEVICH K.A., ESTEIN S.M., LAPLAGNE D.A., ZWERDLING A., DE LA BARRERA S., BOWDEN R., FOSSATI C.A., GIAMBARTOLOMEI G.H. & GOLDBAUM F.A. (2007). A DNA vaccine coding for the chimera BLSOmp31 induced a better degree of protection against *B. ovis* and a similar degree of protection against *B. melitensis* than Rev.1 vaccination. *Vaccine*, **25**, 5958–5967.
- DA COSTA MARTINS R., IRACHE J.M., BLASCO J.M., MUÑOZ M.P., MARÍN C.M., JESÚS GRILLO M., JESÚS DE MIGUEL M., BARBERÁN M. & GAMAZO C. (2010). Evaluation of particulate acellular vaccines against *Brucella ovis* infection in rams. *Vaccine*, **28**, 3038–3046.
- DE MIGUEL M.J., MARÍN C.M., MUÑOZ P.M., DIESTE L., GRILLÓ M.J. & BLASCO J.M. (2011). Development of a selective culture medium for primary isolation of the main *Brucella* species. *J. Clin. Microbiol.*, **49**, 1458–1463.
- DIAZ R. & BOSSERAY N. (1973). Identification d'un composé antigénique spécifique de la phase rugueuse (R) des *Brucella*. *Ann. Rech. Vet.*, **4**, 283–292.
- ESTEIN S.M., BALDI P.C. & BOWDEN R.A. (2002). Comparison of serological tests based on outer membrane or internal antigens for detecting antibodies to *Brucella ovis* in infected flocks. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **14**, 407–411.
- GALL D., NIELSEN K., VIGLIOCCO A., SMITH P., PEREZ B., ROJAS X. & ROBLES C. (2003). Evaluation of an indirect enzyme-linked immunoassay for presumptive serodiagnosis of *Brucella ovis* in sheep. *Small Rumin. Res.*, **48**, 173–179.
- GARCÍA-PASTOR L., BLASCO J.M. & BARBERÁN M. (2009). Pasteurellosis as a cause of genital lesions in rams. A descriptive study. *Small Rumin. Res.*, **87**, 111–115.
- GRILLÓ M.J., MARÍN C., BARBERÁN M. & BLASCO J.M. (1999). Experimental *Brucella ovis* infection in pregnant ewes. *Vet. Rec.*, **144**, 555–558.
- JIMÉNEZ DE BAGÜES M.P., BARBERÁN M., MARÍN C.M. & BLASCO J.M. (1995). The *Brucella abortus* RB51 vaccine does not confer protection against *Brucella ovis* in rams. *Vaccine*, **13**, 301–304.
- LIVINGSTONE C.W. & HARDY W.T. (1964). Isolation of *Actinobacillus seminis* from ovine epididymitis. *Am. J. Vet. Res.*, **25**, 660–663.
- MARÍN C.M., ALABART J.L. & BLASCO J.M. (1996). Effect of antibiotics contained in two *Brucella* selective media on growth of *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. ovis*. *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 426–428.
- MARÍN C.M., ALONSO-URMENETA B., MORIYÓN I., PEREZ S. & BLASCO J.M. (1998). Comparison of polyclonal, monoclonal and protein G peroxidase conjugates in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella ovis* in sheep. *Vet. Rec.*, **143**, 390–394.
- MARÍN C.M., BARBERÁN M., JIMÉNEZ DE BAGÜES M.P. & BLASCO J.M. (1990). Comparison of subcutaneous and conjunctival routes of Rev. 1 vaccination for the prophylaxis of *Brucella ovis* infection in rams. *Res. Vet. Sci.*, **48**, 209–215.
- MUÑOZ P., DE MIGUEL M.J., GRILLÓ M.J., MARÍN C.M., BARBERÁN M. & BLASCO J.M. (2008). Immunopathological responses and kinetics of *B. melitensis* Rev 1 infection after subcutaneous or conjunctival vaccination in rams. *Vaccine*, **26**, 2562–2569.
- MUÑOZ P.M., ESTEBAN M., MARÍN, C.M., DE MIGUEL M.J., GRILLÓ M.J., BARBERÁN M., IRACHE J.M., BLASCO J.M. & GAMAZO C. (2006). *Brucella* outer membrane complex-loaded microparticles as a vaccine against *Brucella ovis* in rams. *Vaccine*, **24**, 1897–1905.
- MYERS D.M., JONES L.M. & VARELA-DIAZ V. (1972). Studies of antigens for complement fixation and gel diffusion tests in the diagnosis of infections caused by *Brucella ovis* and other *Brucella*. *Appl. Microbiol.*, **23**, 894–902.
- NIELSEN K., SMITH P., CONDE S., DRAGHI de BENITEZ G., GALL D., HALBERT G., KENNY K., MASSENGILL C., MUENKS Q., ROJAS X, PEREZ B., SAMARTINO L., SILVA P., TOLLERSRUD T. & JOLLEY M. (2004). Rough lipopolysaccharide of *Brucella abortus* RB51 as a common antigen for serological detection of *B. ovis*, *B. canis*, and *B. abortus* RB51 exposure using indirect enzyme immunoassay and fluorescence polarization assay. *J. Immunoassay Immunochem.*, **25**, 171–182.

PRAUD A., CHAMPION J.L., CORDE Y., DRAPEAU A., MEYER L. & GARIN-BASTUJI B. (2012). Assessment of the diagnostic sensitivity and specificity of an indirect ELISA kit for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *BMC Vet. Res.*, **8**:68.

RIDLER A.L., WEST D.M. & COLETT M.G. (2012). Pathology of *Brucella ovis* infection in red deer stags (*Cervus elaphus*). *N. Z. Vet. J.*, **60**, 146–149.

RIEZU-BOJ J.I., MORIYÓN I., BLASCO J.M., MARÍN C.M. & DIAZ R. (1986). Comparison of lipopolysaccharide and outer membrane protein-lipopolysaccharide extracts in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella ovis* infection. *J. Clin. Microbiol.*, **23**, 938–942.

RIS D.R., HAMEL K.L. & LONG D.L. (1984). Comparison of an enzyme-linked immunospecific assay (ELISA) with the cold complement fixation test for the serodiagnosis of *Brucella ovis* infection. *N.Z. Vet. J.*, **32**, 18–20.

SANTOS J.M., VERSTREATE D.R., PERERA V.Y. & WINTER A.J. (1984). Outer membrane proteins from rough strains of four *Brucella* species. *Infect. Immun.*, **46**, 188–194.

VIGLIOCCO A.M., SILVA PAULO P.S., MESTRE J., BRIONES G.C., DRAGHI G., TOSSI M. & NIELSEN K. (1997). Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of ovine antibody to *Brucella ovis*. *Vet. Microbiol.*, **54**, 357–368.

XAVIER M.N., SILVA T.M.A., COSTA E.A., PAIXAO T.A., MOUSTACAS V.S., CARVALHO C.A. Jr., SANT'ANNA F.M., ROBLES C.A., GOUVEIA A.M.G., LAGE A.P., TSOLIS R.M. & SANTOS R.L. (2010). Development and evaluation of a species-specific PCR assay for the detection of *Brucella ovis* infection in rams. *Vet. Microbiol.*, **145**, 158–164.

\*

\* \*

**NB:** Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la Epididimitis ovina (*Brucella ovis*) (puede consultarse la lista más actualizada en la Tabla de la Parte 4 de este *Manual Terrestre* o en la página web de la OIE: <http://www.oie.int/esp/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>) Por favor, contacte con el Laboratorio de Referencia de la OIE para cualquier otro dato sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la epididimitis ovina (*Brucella ovis*)

**NB:** ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1991 COMO BRUCELOSIS EN OVEJAS, CABRAS Y PORCINOS; CAPÍTULO ADOPTADO POR PRIMERA VEZ CON TÍTULO ACTUAL EN 1996. ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2015.