

David Martínez Durán

Estudio epidemiológico sobre
brucelosis por *Brucella suis* en
jabalíes, liebres y perros de caza
en Aragón

Departamento
Patología Animal

Director/es

Fernández de Luco Martínez, Daniel
Blasco Martínez, José María

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO SOBRE BRUCELOSIS
POR *BRUCELLA SUIIS* EN JABALÍES, LIEBRES Y
PERROS DE CAZA EN ARAGÓN

Autor

David Martínez Durán

Director/es

Fernández de Luco Martínez, Daniel
Blasco Martínez, José María

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Patología Animal

2014

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

FACULTAD DE VETERINARIA

Área de Sanidad Animal. Departamento de Patología Animal

**Estudio epidemiológico sobre brucelosis por *Brucella suis* en
jabalíes, liebres y perros de caza en Aragón**

TESIS DOCTORAL

Memoria presentada por el Licenciado

D. David Martínez Durán

Para optar al grado de Doctor en Veterinaria



Departamento de
Patología Animal
Universidad Zaragoza



D. Daniel Fernández de Luco Martínez, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza,

D. Jose María Blasco Martínez, Investigador de la Unidad de Sanidad Animal del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria del Gobierno de Aragón,

INFORMAN:

Que la memoria titulada “**Estudio epidemiológico sobre brucelosis por *Brucella suis* en jabalíes, liebres y perros de caza en Aragón**”, presentada por el Licenciado en Veterinaria y Bioquímica D. **David Martínez Durán**, ha sido realizada bajo su dirección, cumpliendo los requisitos exigidos en la legislación vigente y ajustándose al proyecto de Tesis Doctoral inicialmente presentado para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

Zaragoza, a 25 de marzo de dos mil catorce.

Daniel Fernández de Luco Martínez
Doctor en Veterinaria

Jose María Blasco Martínez
Doctor en Veterinaria

Este trabajo ha sido posible gracias al proyecto **INIA FAU2008-00015-C02-00** y el **Gobierno de Aragón**, mediante la colaboración del Departamento de Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente para la realización del seguimiento sanitario de la fauna cinegética en la Comunidad Autónoma de Aragón.

A mis padres, Marisa y Pedro
A mis hermanos, Javier y Pedro
A mis cuñadas, Eva y Montse
A mis sobrinas, Ana, Emma y Paula

AGRADECIMIENTOS

Llegado este momento de escribir los agradecimientos me viene a la mente cuando comencé con esta Tesis y pensaba cuando llegaría este instante. Después de tanto tiempo, aquel sueño de ser Doctor, de hacer una Tesis por fin se materializa lentamente, casi sin darme cuenta de cómo ha pasado el tiempo. Durante mi estancia en la Facultad de Veterinaria, la cual considero una parte más de mi casa, he compartido momentos y vivencias con numerosas personas y compañeros que han marcado mi vida y el camino a seguir.

Me gustaría agradecer al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria y al Gobierno de Aragón, en especial al Departamento de Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente por su interés en el estudio de la patología de la fauna silvestre.

A mis directores, El Dr. Daniel Fernández de Luco, agradecerle la oportunidad de trabajar en su equipo, sus consejos, su paciencia y su esfuerzo invertido en este trabajo, mi más sincero agradecimiento. El Dr. Jose María Blasco Martínez, agradecerle la dedicación que ha tenido conmigo, su paciencia y sus consejos. Gracias a ellos me he sentido “a hombros de gigantes” realizando esta Tesis.

Al Dr. Juan José Badiola, a quien debo dar las gracias por acogernos en el “Centro de Investigación en Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes” y poner a nuestra disposición sus instalaciones y tratarnos como uno más de la familia.

A la Dra. Montse Barberán, agradecerle todo y más, su infinita paciencia y su ayuda en cualquier momento y situación. Gracias por los kilos de caramelos (Pikotas) y gracias por estar siempre dispuesta a ayudarnos. De todo corazón le estoy muy muy agradecido, un placer compartir este tiempo contigo.

A la Dra. Maricreu Arnal y al Dr. Miguel Revilla, agradeceros vuestra amistad, han sido varios años de trabajar juntos, muchas horas juntos, días y hasta semanas, como decía Miguel de trabajar “codo con codo, como en el antiguo despacho”. Este trabajo también es vuestro, yo solo lo he plasmado en papel, vosotros sabéis que somos un equipo. Agradeceros vuestro compañerismo y amistad.

A Ixeya, sin ti, yo no estaría en esta situación.

A la Dra. Cristina Acín, infinitas gracias por los ánimos, la ayuda y llamar todos los días a la puerta, con esa alegría tan maravilla.

A Santiago Becerra, compañero y titular indiscutible en la sala de necropsias, darle las gracias por su apoyo y compañerismo en todas las situaciones, para mí uno más del equipo de trabajo. Que no pare la música.

Al resto de compañeros del centro, a los que están y los que se fueron (África, Antonia, Arancha, Belén, Carlos, Eva, Hicham, Jose Luis, Lourdes, Mamen, Marta, Nico, Nuria, Pilar, Roció, Rodrigo, Rosa, Sara, Silvia Castejón, Silvia Ruiz, Yolanda y William) gracias por los momentos que hemos compartido.

Agradecer también al CITA, a las chicas de Torre Brucella, para mí siempre será "Torre Brucella", gracias por hacerme sentir uno más del equipo, gracias por esos cafés, gracias de todo corazón. Gracias a Chus, Clara y Pilar por sus magníficos listados y ayuda, a Lucia gracias por hacerme ver cómo funcionaban las cosas, yo fui tu becario y gracias a Maria y Sara por esas siembras tan largas y magníficas charlas entre muestra y muestra.

A Leoncio Galan, por su increíble manejo de las liebres y su hospitalidad.

Parte fundamental de esta Tesis han sido los Agentes de Protección de la Naturaleza del Gobierno de Aragón, los titulares de los cotos, cazadores y celadores comarcales que cuentan con un maravillo capital humano. Son pieza fundamental en esta Tesis, sin ellos el trabajo no hubiera sido posible. Darles las gracias, con ellos he compartido trabajo y también hemos pasado muy buenos ratos. Gracias a todos por su amabilidad y generosidad.

Al Dr. Raul Mainar, gracias por esa ayuda con la estadística, fuiste luz en un momento de oscuridad.

A Nacho Ruiz, gracias por la compañía constante, gracias por esos magníficos mapas, por esa ayuda inestimable con la estadística y esa mirada crítica. Gracias por ser compañero de cuerda en esta Tesis.

A Rubén García y su familia, por haber creído tanto en mí, por no dejarme nunca solo y empujar siempre hacia delante. Que no pare la fiesta.

A Pier Guisepppe Meneguz y Luca Rossi, profesores de la Universidad de Turín, vosotros fuisteis los primeros en abrirme las puertas al estudio de la fauna. Con vosotros coloque las primeras piedras de mi conocimiento.

A Ángel y Jose Manuel, técnicos de informática de la Facultad de Veterinaria, que tantas veces habéis salvado mi trabajo y que me habéis ayudado cuando pensaba que tenía todo perdido.

No puedo dejar escapar la ocasión de agradecer a los amigos que me han acompañado a lo largo de todo este tiempo. A los compañeros de promoción de la Faculta de Veterinaria (Amaia, Latorre, Fernando, Jabón, Pedro, Ponz, Raúl y Viti). A los amigos de la Bodega (Angelito, Ballano, Benito, Chipi, Mario, Nacho, Paco, Paneta, Perrus y Tico) gracias por vuestro apoyo siempre incondicional, gracias por interesaros y preguntar. Cuantas veces os conté entre copas lo que hacía, aquí está el resultado!! A la gente de la Happy Family por esas noches estupendas, Calatayud no sería lo mismo sin vosotros.

A mis compañeros de Erasmus Torino 1999-2000, que después de tanto tiempo parece que fue ayer. Gracias a las chicas de Via Ormea, a la gente de Corso Sebastopoli, Corso Carducci, Via Po y Via Rossini. Gracias por los ánimos, las llamadas y que después de tanto tiempo parece que aún fue ayer.

También dar las gracias a mis compañeras de la Facultad de Ciencias (Ana, Angela, Elena, Maria, Merche y Patricia) de la licenciatura de Bioquímica, vosotras fuisteis lo mejor. A los chicos de Club de Montaña Ayud (Antonio Ramis, Aragües, Heredia, Juanote, Larios, Martinazo, Recio, Roy, Tron, Vicente) cuantas cosas he aprendido de vosotros y cuantas veces os he contado lo que hacía. Gracias a la gente de la Peña La Solera, va por ti Abuelo, estés donde estés.

A la sección italiana, infinitas gracias a la familia Mattalia y la gente de Beinette, todos vosotros sois una parte fundamental de esta Tesis y ocupáis un espacio en mi corazón, al final soy un Cunesse. Ana, Isa, Marcos vivir con vosotros fue para mí una época estupenda, donde aprendí el arte de la clínica Veterinaria, de la cocina y la amistad.

Si a lo largo de mi paso por la Facultad de Veterinaria han sido muchos los compañeros y amigos que me han ayudado, que voy a decir de mi familia. Durante este tiempo siempre han estado apoyándome, animándome y en el final sufriendome.

A mis hermanos Javier y Pedro que siempre me han apoyado en todo y no han dejado que saltara sin red. A mis padres Marisa y Pedro, muchas gracias por la educación recibida sin la cual no hubiese llegado aquí, costase lo que costase. A mis cuñadas Eva y Montse que suerte teneros y a mis sobrinas Ana, Emma y Paula. A mis innumerables primos hermanos que son como hermanos (Alberto, Dolores, Kike, Juan Carlos, Pedro Jesus, Ramiro...). A mis tios Manolo y Manuel "el americano", que por el discurrir de la vida no están presentes.

Al final cada uno da lo que recibe y luego recibe lo que da, nada es más simple, no hay otra norma, nada se pierde, todo se transforma.

Me gustaría acabar haciendo mención a la intrahistoria de esta Tesis. Hay otro material y métodos, otros resultados, otra discusión y otras conclusiones.

Sobre el otro material y métodos puedo dar las gracias al Corsa y Navara, me habéis permitido recorrer toda la geografía aragonesa, sin dejarme nunca tirado, más de 60.000 km, gracias a Repsol y Cepsa, siempre me disteis de beber y de comer, a mí y a los coches (pagando). Gracias a bares, bodegas, casinos, casas de amigos, cocheras, fondas, hoteles, pensiones, refugios y teleclubs, en todos encontré hospitalidad. Gracias al Sistema Ibérico por sus magníficos atardeceres cuando volvía a casa. En esta Tesis he utilizado un par de cuchillos y numerosas pinzas y tijeras que he ido perdiendo por todos los rincones. He utilizado infinitos rotuladores, bolsas y tubos de plástico, he manchado de sangre numerosos pantalones y zapatillas. He realizado centenares de fotografías de cada rincón de esta región y he estado en las 33 comarcas que forman Aragón. He perdido un GPS en el valle de Otal y volveré a buscarlo. He aprendido a escuchar a la gente, a permanecer en silencio, a entender sus situaciones, a transmitir la información necesaria y hacerse valer. He aprendido muchas cosas que no están en la tesis pero son necesarias para su realización. Los otros resultados han sido geniales y sorprendentes. La otra discusión, no hay cabida para la duda. Las otras conclusiones son claras y rotundas, mereció la pena tanto tiempo, dedicación y esfuerzo.

A todos muchas gracias

ÍNDICE

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN.....	1
2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1.- GENERALIDADES: TAXONOMÍA Y ESTRUCTURA ANTIGÉNICA.....	5
2.2.- BRUCELOSIS EN FAUNA SILVESTRE.....	10
2.2.1.- ORDEN: ARTIODACTYLA	13
2.2.1.1.- Familia: <i>Bovidae</i>	13
2.2.1.2.- Familia: <i>Cervidae</i>	19
2.2.1.3.- Familia: <i>Camelidae</i>	23
2.2.1.4.- Familia: <i>Antilocapridae</i>	24
2.2.1.5.- Familia: <i>Suidae</i>	24
2.2.1.6.- Familia: <i>Tayassuidae</i>	28
2.2.2.- ORDEN: LAGOMORPHA	28
2.2.3.- ORDEN: CARNIVORA.....	29
2.2.4.- ORDEN: RODENTIA.....	32
2.2.5.- MAMIFEROS MARINOS	33
2.3.- ESTRATEGIAS DE DIAGNÓSTICO DE LA BRUCELOSIS Y SU APLICACIÓN A LOS ESTUDIOS DE FAUNA SILVESTRE.....	34
3.- MATERIAL Y MÉTODOS	45
3.1.- ÁREA Y PERIODO DE ESTUDIO.....	45
3.2.- ESTUDIO DE LA BRUCELOSIS EN EL JABALÍ	47
3.2.1.- OBTENCIÓN Y ORIGEN GEOGRÁFICO DE LAS MUESTRAS.....	47
3.2.2.- METODOLOGÍA DE ESTUDIO	53
3.2.2.1.- Estudio serológico	53
3.2.2.2.- Estudio bacteriológico y molecular de las cepas aisladas.....	54
3.2.2.3.- Estudio anatomopatológico	55
3.3.- ESTUDIO DE BRUCELOSIS EN LA LIEBRE	57

3.3.1.- OBTENCIÓN Y ORIGEN GEOGRÁFICO DE LAS MUESTRAS	57
3.3.2.- METODOLOGÍA DE ESTUDIO.....	62
3.3.2.1.- Estudio serológico.....	62
3.3.2.1.1.- Obtención de sueros positivos y negativos de referencia.....	62
3.3.2.1.2.- Preparación del inóculo	63
3.3.2.1.3.- Procedimiento de obtención de sueros e hiperinmunización.....	64
3.3.2.1.4.- Puesta a punto del método iELISA con sueros de liebre	65
3.3.2.2.- Estudio bacteriológico.....	67
3.3.2.3.- Estudio anatomopatológico	67
3.4.- ESTUDIO DE LA SEROPREVALENCIA DE BRUCELOSIS EN LOS PERROS DE CAZA.....	68
3.4.1.- OBTENCIÓN Y ORIGEN GEOGRÁFICO DE LAS MUESTRAS	68
3.4.2.- METODOLOGÍA DE ESTUDIO.....	71
3.4.2.1.- Determinación de anticuerpos inducidos por infecciones por especies lisas de <i>Brucella</i>	71
3.4.2.2.- Estudio bacteriológico.....	72
3.5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO	73
4.- RESULTADOS.....	75
4.1.- RESULTADOS EN EL JABALÍ.....	75
4.1.1.- RESULTADOS SEROLÓGICOS.....	75
4.1.1.1.- Distribución de la seroprevalencia de brucelosis en jabalí en función de la temporada de caza y distribución por comarcas	75
4.1.1.2.- Distribución de la seroprevalencia de brucelosis en jabalí en función de la edad y sexo	77
4.1.2.- RESULTADOS BACTERIOLÓGICOS	79
4.1.2.1.- Frecuencia de aislamiento de <i>B. suis</i> biovar 2 en jabalí en función de la temporada de caza y distribución por comarcas	79
4.1.2.2.- Frecuencia de aislamiento de <i>B. suis</i> biovar 2 en función de la edad y sexo.....	81

4.1.2.3.- Frecuencia de aislamiento de <i>B. suis</i> biovar 2 en jabalí en función del origen y naturaleza de la muestra analizada	83
4.1.2.4.- Caracterización molecular de las cepas de <i>B. suis</i> biovar 2 aisladas en jabalí.....	84
4.1.3.- RESULTADOS ANATOMOPATOLÓGICOS DE BRUCELOSIS EN EL JABALÍ.....	89
4.2- RESULTADOS EN LAS LIEBRES.....	92
4.2.1.- RESULTADOS SEROLÓGICOS	92
4.2.2.- RESULTADOS BACTERIOLÓGICOS.....	95
4.2.3.- RESULTADOS ANATOMOPATOLÓGICOS.....	96
4.3- RESULTADOS EN LOS PERROS DE CAZA.....	96
4.3.1.- RESULTADOS SEROLÓGICOS	96
4.3.2.- RESULTADOS BACTERIOLÓGICOS.....	99
5.- DISCUSIÓN.....	101
5.1.- ESTUDIOS EN EL JABALÍ	102
5.2.- ESTUDIOS EN LA LIEBRE.....	116
5.3.- ESTUDIOS EN EL PERRO DE CAZA	121
6.- CONCLUSIONES	125
7.- RESUMEN	127
8.- SUMMARY	129
9.- BIBLIOGRAFÍA	131
10.- PÁGINAS WEB	177
11.- ÍNDICE DE TABLAS	179
12.- ÍNDICE DE FIGURAS	181
13.- ABREVIATURAS.....	183

INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

La brucelosis es considerada una de las zoonosis más ampliamente distribuida en el mundo (Boschioli *et al.*, 2001; Pappas *et al.*, 2006), causando numerosos problemas sanitarios y socioeconómicos. Las tres principales especies del género *Brucella* (*B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*) provocan la enfermedad en sus hospedadores naturales domésticos (bovino, ovino-caprino y porcino, respectivamente), caracterizada esencialmente por abortos e infertilidad y responsable de graves pérdidas económicas en la ganadería (Acha & Szyfres, 2001; Cutler *et al.*, 2005). Las especies silvestres también pueden padecerla y jugar un papel importante en su epidemiología (Davis, 1990; Rementsova, 1987; Rhyan, 2000).

Las campañas de control y erradicación que se están llevando a cabo desde hace muchos años en diferentes países del mundo, tienen un efecto directo en la salud pública, ya que la disminución de los casos en animales se acompaña siempre de una reducción de los casos humanos (Castrucci, 2000; Ragan, 2002). Estas campañas se aplican exclusivamente en las especies domésticas, quedando relegadas las especies silvestres que, en ocasiones, pueden actuar como reservorio de la infección dificultando su control y erradicación.

Los animales silvestres comparten numerosas enfermedades con el ganado doméstico y, en consecuencia, la existencia de reservorios silvestres puede complicar la erradicación y control de las mismas en los animales domésticos (Davis & Elzer, 2002; Gortázar *et al.*, 2007a). En aquellos casos como la brucelosis, en los que merced a la aplicación continuada de programas de control en el ganado doméstico se han alcanzado bajas prevalencias, adquiere especial importancia la identificación de los potenciales reservorios silvestres (Davis & Elzer, 2002). Por esta razón los programas de vigilancia sanitaria en poblaciones silvestres son de sumo interés para el control de las enfermedades compartidas con los animales domésticos (Kuiken *et al.*, 2005; Mörner *et al.*, 2002). Entre los potenciales reservorios silvestres de la brucelosis se encuentran los ungulados silvestres, que durante las últimas décadas han tenido una considerable expansión e incremento demográfico en Europa (Apollonio *et al.*, 2010), España (Acevedo *et al.*, 2005; Blanco *et al.*, 1998) y Aragón (Gortázar *et al.*, 2000; Osuna *et al.*, 2006). Aunque no se conoce con total precisión el papel que juega la fauna silvestre en la

epidemiología de la brucelosis en España (Gortázar *et al.*, 2007a; León-Vizcaíno *et al.*, 2009), uno de los estudios más amplios y rigurosos llevados a cabo en nuestro país, viene a demostrar que los rumiantes silvestres serían más una víctima ocasional de la brucelosis transmitida por el ganado doméstico infectado por *B. melitensis* o *B. abortus*, que un verdadero reservorio de estas infecciones (Muñoz *et al.*, 2010). Puesto que no existen vacunas efectivas capaces de proteger a la fauna silvestre (Davis & Elzer, 2002), el control de la brucelosis debida a *B. melitensis* o *B. abortus* en especies silvestres debe basarse en prácticas de manejo adecuadas, evitando la interacción entre las especies silvestres y domésticas (Godfroid *et al.*, 2013).

Sin embargo, en contraste con lo indicado para los rumiantes silvestres, el estudio mencionado puso en evidencia que las poblaciones ibéricas de jabalí *Sus scrofa* estaban seriamente afectadas por *B. suis* biovar 2 (Muñoz *et al.*, 2010). Esta situación es muy similar en las poblaciones de jabalí de toda Europa, por lo que esta especie animal, junto con la liebre europea *Lepus europaeus*, se consideran como el reservorio principal de la brucelosis porcina causada por *B. suis* biovar 2 en Europa (Cvetnić *et al.*, 2003; Godfroid *et al.*, 2005; Muñoz *et al.*, 2010; Pikula *et al.*, 2005; Szulowski *et al.*, 1999). En la actualidad, la brucelosis porcina ocasionada por *B. suis* biovar 2 es una enfermedad emergente en toda Europa, y se asocia al incremento de las explotaciones extensivas de porcino y a la elevada densidad de jabalíes infectados (Godfroid *et al.*, 1994; Godfroid, 2002; Godfroid & Käsbohrer, 2002; Kautzsch *et al.*, 1995). El jabalí es una de las piezas de caza mayor más abatidas en Europa por lo que, cuenta tenida de la elevada prevalencia de *B. suis* biovar 2 en esta especie, su caza podría ser una actividad de riesgo durante la manipulación de las canales. Por fortuna, *B. suis* biovar 2 se muestra muy poco patógena para el hombre, a diferencia de lo que ocurre con las biovariedades 1 y 3 de *B. suis*, que por el momento, no han sido identificadas en jabalíes en Europa (Algers *et al.*, 2009).

A diferencia de lo que ocurre en el jabalí, existe muy poca información acerca de la situación de la brucelosis en la liebre en España y su papel epidemiológico. En el caso de Aragón la situación de la brucelosis en esta especie animal es totalmente desconocida. Además, se desconoce también el papel epidemiológico que los perros, una especie relacionada estrechamente con el jabalí durante su caza, podrían jugar en el caso de la infección por *B. suis* biovar 2.

En consecuencia, los objetivos principales de este trabajo son los siguientes:

- 1) Determinar la distribución espacial y temporal de la seroprevalencia de brucelosis en el jabalí durante el periodo de estudio 2008-2012.
- 2) Poner a punto la metodología precisa para el diagnóstico de brucelosis en las liebres, determinando si la infección y enfermedad existen en la liebre europea *Lepus europaeus* y/o la liebre ibérica *Lepus granatensis* en Aragón.
- 3) Determinar si la brucelosis producida por *B. suis* biovar 2 afecta a los perros que intervienen en las cacerías de jabalí.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1.- GENERALIDADES: TAXONOMÍA Y ESTRUCTURA ANTIGÉNICA

El género *Brucella* está constituido por diversas especies de bacterias Gram-negativas, que son patógenas intracelulares facultativas y capaces de multiplicarse tanto en el interior de las células del hospedador como en otras condiciones. Si bien las bacterias de género *Brucella* se pueden cultivar en el laboratorio sin gran dificultad en medios inertes, su hábitat primario son las células de los hospedadores que infecta, y su presencia fuera de los mismos es solo accidental y por un tiempo reducido. Esta estrecha asociación con el hospedador guarda relación con la estructura y fisiología de la bacteria y es reflejo de su posición taxonómica (Corbel, 1997; Corbel & Brinley-Morgan, 1984). El análisis genético del perfil proteico y la reactividad cruzada, así como la composición química de la envoltura celular y ciertos aspectos de su fisiología, sitúan a *Brucella* dentro de la subdivisión α -2 de la clase *Proteobacteria*, en la que están incluidos también otros patógenos de animales (*Rickettsia* y *Bartonella*), endosimbiontes de vegetales (*Agrobacterium* y *Rhizobium*) y ciertas bacterias de la tierra. Las semejanzas biológicas entre los miembros de la subdivisión α -2 demuestran que la asociación con células eucariotas es una tendencia evolutiva de estas bacterias y explica por qué comparten ciertas estrategias y factores de virulencia, independientemente de que sus hospedadores sean animales o vegetales (Moreno, 1992; Moreno & Moriyón, 2001; Ugalde, 1999).

Por lo tanto, aunque las brucelas sean patógenos intracelulares de animales, comparten una estrecha relación con organismos del suelo (Paulsen *et al.*, 2002; Wattam *et al.*, 2009), con simbiosis de plantas y con bacterias fitopatógenas que, al igual que *Brucella*, tienen la habilidad o la necesidad de vivir en asociación con células eucariotas (Moreno, 1992; Whatmore, 2009). El género *Brucella* está compuesto por diferentes especies de cocobacilos Gram-negativos, inmóviles y aerobios estrictos, de crecimiento lento, que no poseen cápsulas ni forman esporas, y que son capaces de vivir y replicarse en el interior de células del sistema fagocítico mononuclear del hospedador (Corbel, 1997; Corbel & Brinley-Morgan, 1984). El genoma de *Brucella* está formado por dos cromosomas circulares (con la notable excepción de *B. suis* biovar 3, que posee un solo cromosoma), y no se ha puesto en evidencia la existencia de plásmidos en ninguna de las especies de este género (Michaux-Charachon *et al.*, 1997). Del mismo modo que otras

bacterias Gram-negativas, el género *Brucella* tiene un componente estructural principal en la membrana externa, el lipopolisacárido (LPS), que además de su función estructural, es un importante factor de virulencia (Lapaque *et al.*, 2005). Dependiendo de la naturaleza de dicho LPS, la morfología colonial se denomina “lisa” (S) o “rugosa” (R). De hecho, es habitual dividir el género *Brucella* en dos grandes grupos según su morfología colonial: las especies rugosas y las especies lisas. El género se ha agrupado en 6 especies clásicas (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis* y *B. canis*) siguiendo, entre otros, el criterio de su hospedador animal preferencial y sus características de patogenicidad. Además, dentro de algunas de estas especies clásicas se han diferenciado biotipos o biovariedades: por el momento *B. abortus* posee 8, *B. melitensis* tres y *B. suis* cinco (Nielsen, 2012). Las brucelas son un grupo muy homogéneo genéticamente, con valores de hibridación ADN-ADN próximos al 100%, por lo que se ha propuesto que todas las especies clásicas se incluyan en una sola -*B. melitensis*- (Verger *et al.*, 1985). Sin embargo, no existen razones científicas ni prácticas para admitir que *Brucella* sea un género mono-específico y el rango de hospedador es, con algunas excepciones, un buen criterio biológico para definir las especies (Moreno & Moriyón, 2001). A las 6 especies clásicas mencionadas antes, en los últimos años se han añadido otras dos nuevas, *B. cetii* y *B. pinnipedialis*, aisladas de diversas especies de mamíferos marinos (Foster *et al.*, 2007). Además, una nueva enfermedad fue identificada en el topillo campesino *Microtus arovalis* en Chequia, y una nueva especie, *B. microti*, aislada de los topillos enfermos, así como de zorros y del suelo (Hubálek *et al.*, 2007; Scholz *et al.*, 2008; Scholz *et al.*, 2009). Finalmente, otra nueva especie, *B. inopinata*, aislada a partir de un implante de glándula mamaria en una paciente con signos de brucelosis, ha sido también incluida recientemente dentro del género (Scholz *et al.*, 2010). Teniendo en consideración que algunas cepas que presentan las características de *Brucella*, pero diferentes a las especies descritas hasta ahora, han sido aisladas también en un paciente humano con historial de neumonía crónica (Tiller *et al.*, 2010), de casos de abortos en babuinos (Schlabritz-Loutsevitch *et al.*, 2009), así como de abscesos en ranas (Eisenberg *et al.*, 2012; Fischer *et al.*, 2012), parece razonable concluir que la clasificación y situación taxonómica definitivas de este complejo género bacteriano restan por ser definidas todavía con suficiente precisión.

Como se ha indicado, atendiendo a la morfología lisa (S) o rugosa (R) de la superficie de las colonias cuando se examinan en la lupa con luz incidente tras ser teñidas con una solución de cristal violeta y oxalato de amonio (Alton *et al.*, 1988), se

acostumbra a diferenciar las especies de *Brucella* en dos grandes grupos: las rugosas (*B. ovis* y *B. canis*) y las lisas (todas las demás). Este fenómeno refleja diferencias estructurales y antigénicas en la envoltura celular y, muy particularmente, en el lipolisacárido (LPS). La estructura más característica de las bacterias Gram-negativas es su envoltura celular, formada por una membrana externa, la membrana interna (o citoplasmática), y un periplasma intermedio entre las anteriores. La membrana externa contiene los antígenos inmunodominantes y está constituida por fosfolípidos, proteínas y LPS. La asimetría en la distribución del LPS, junto con sus propiedades y las proteínas de la membrana externa, hace que esta actúe como una barrera de permeabilidad. Siendo *Brucella* una bacteria Gram-negativa, su envoltura celular se adapta a este modelo, si bien su membrana externa es diferente a la típica de las bacterias Gram-negativas (enterobacterias y pseudomonas). La diferencia radica, en primer lugar, en que es relativamente permeable a agentes hidrófobos, con diferencias entre especies y biovariedades que se reflejan en las técnicas bacteriológicas de tipificación (Martínez de Tejada & Moriyón, 1993). En segundo lugar, es resistente a los péptidos catiónicos bactericidas presentes en lisosomas y fluidos corporales (lisozima, lactoferrina, defensinas, etc.) y a otros policationes bactericidas como la polimixina B (Martínez de Tejada *et al.*, 1995).

Como en otras bacterias Gram-negativas, el LPS-S consta de una parte glucolípídica (lípidos A), insertada en la membrana externa y por tanto no expuesta en la superficie, y otra polisacáridica dirigida hacia el exterior, y dividida en dos secciones: el núcleo oligosacáridico, más interno, y el polisacárido O, también llamado cadena O. El LPS es el antígeno principal de la bacteria y el que estimula una respuesta inmune mediada por anticuerpos que es rápida, intensa y duradera, pero no induce hipersensibilidad retardada (Díaz *et al.*, 1968). El lípido A es diferente del típico de las bacterias Gram-negativas clásicas, lo que explica que muchas de las actividades características de los LPSs, como la estimulación de los macrófagos, sean en general más bajas en *Brucella* que en otros Gram-negativos. La estructura básica del lípido A es igual en todas las especies de *Brucella*, si bien pudieran existir pequeñas diferencias cuantitativas a nivel de los ácidos grasos. El lípido A no tiene relevancia diagnóstica (Moreno & Moriyón, 2001).

La estructura del núcleo oligosacáridico no se conoce en detalle, y puede estar completa o, por el contrario, reducida en los mutantes rugosos. Se desconoce si hay diferencias a este nivel entre las distintas especies de *Brucella*. En otras bacterias Gram-

negativas, el núcleo y el lípido A del LPS juegan un papel crítico en la impermeabilidad frente a agentes hidrófobos y representan el lugar primario de acción de los péptidos bactericidas (Velasco *et al.*, 2000). El LPS de *Brucella* es diferente, ya que no actúa como tal barrera y es refractario a la unión de tales péptidos (Velasco *et al.*, 2000). Muchos hospedadores infectados por *Brucella* producen anticuerpos frente a esta sección interna del LPS, pero su análisis requiere pruebas especiales no disponibles en los laboratorios de rutina (Rojas *et al.*, 1994).

El polisacárido O (O/PS) constituye la sección más externa e inmunodominante del LPS-S y, por tanto, de la totalidad de la bacteria. Está formado por un homopolímero de N-formil-perosamina (Caroff *et al.*, 1984). En la biovar 1 de *B. abortus* el único enlace que presenta este polímero es de tipo α -1,2 mientras que en *B. melitensis* biovar 1 hay un enlace α -1,3 por cada cuatro enlaces α -1,2, que se encuentran en una sola cadena de longitud heterogénea (entre 25 y 130 azúcares). Por tanto, en el O/PS de *B. abortus* biovar 1 hay trechos de 5 o más azúcares con el mismo enlace (α -1,2), mientras que en *B. melitensis* biovar 1 hay un enlace (α -1,3) ausente en el primero. Esto genera tres tipos básicos de epítomos: A (5 o más azúcares en enlace α -1,2); M (que contiene el enlace α -1,3), y el C o común (4 o menos azúcares con enlaces α -1,2) (Cherwonogrodzky *et al.*, 1990; Douglas & Palmer, 1988). Esto es de gran relevancia práctica ya que la inmensa mayoría de los anticuerpos producidos tras la infección por cepas S de *Brucella* reconocen el epítomo C lo que explica por qué, en el diagnóstico serológico, es irrelevante el origen (*B. abortus*, *B. suis* o *B. melitensis*) del antígeno utilizado (sea una suspensión celular o LPS-S) y, por ello, usando la serología exclusivamente no es posible distinguir el serotipo (AC, MC o AMC) de la cepa infectante (Alonso-Urmeneta *et al.*, 1998). Como queda dicho, el O/PS (cadena O) está totalmente ausente en el LPS de los mutantes rugosos de las especies lisas.

Además de la cadena O del LPS, las cepas de *Brucella* en fase S contiene un segundo polisacárido, que reacciona con anticuerpos producidos durante la infección, pero que no es inmunogénico, y que habitualmente se denomina hapteno nativo -NH- (Aragón *et al.*, 1996). Existe una cierta confusión en el uso de los términos NH, cadena O libre (O/PS) y polisacárido B. Los dos primeros han sido empleados de forma equivalente, pero el O/PS y NH no son estructuras idénticas. Si bien el tipo de azúcar y enlace son semejantes en ambos, el NH contiene alrededor de un 40% de perosamina no formilada, lo que, como puede demostrarse con anticuerpos monoclonales, hace que su estructura

epitópica difiera sutilmente de la del O/PS (Moreno *et al.*, 1981; Moreno *et al.*, 1987). Además, a diferencia de lo que ocurre cuando se extrae el O/PS, cuando se extrae el NH este no está unido al núcleo oligosacárido del LPS y, desde el punto de vista estructural, parece representar una molécula individual que contribuiría a dar a la superficie características de tipo liso sin incrementar la densidad de LPS y sus secciones internas (Aragón *et al.*, 1996). Por lo que respecta al polisacárido B (también denominado “polyB”), algunos consideran erróneamente que es un glucano cíclico periplasmático sin actividad serológica, pero se trata de un polisacárido de perosamina parcialmente formilada, observable por inmunoprecipitación en gel y que se acumula en el citosol del mutante rugoso *B. melitensis* 115B (Alonso-Urmeneta *et al.*, 1998). El polisacárido B es pues semejante al NH, pero no está expuesto en la superficie de la bacteria, pudiendo representar un precursor (Cloekaert *et al.*, 1992; Díaz *et al.*, 1968).

Como en otras bacterias Gram-negativas, la membrana externa de *Brucella* contiene varias proteínas mayoritarias (Cloekaert *et al.*, 1996). Si bien los animales infectados por *Brucella* producen anticuerpos frente a todas o la mayoría de ellas, esta respuesta es de importancia diagnóstica muy reducida en comparación con la generada frente al LPS-S (Riezu-Boj *et al.*, 1990; Zygmunt *et al.*, 1994). Además, los componentes periplasmáticos y citosólicos incluyendo los ácidos nucleicos y ribosomas, sustancias de reserva, y una variedad de proteínas enzimáticas relacionadas fundamentalmente con el metabolismo, se comportan como antígenos relevantes durante la infección, aunque el análisis por inmunoelectroforesis no revela apenas diferencias cualitativas entre las distintas especies de *Brucella* que se han estudiado (Díaz *et al.*, 1968). De manera muy relevante, y a diferencia de lo que ocurre con el LPS-S o su O/PS, estas proteínas citosólicas y periplasmáticas de *Brucella* inducen hipersensibilidad retardada, aspecto de gran interés diagnóstico.

2.2.- BRUCELOSIS EN FAUNA SILVESTRE

Las especies de *Brucella* más importantes desde el punto de vista de producción animal y salud pública son *B. abortus*, responsable de la brucelosis bovina, *B. melitensis*, principal agente causal de la brucelosis ovina y caprina, y *B. suis*, responsable de la brucelosis porcina (Corbel, 1997; Nielsen, 2012). Estas 3 especies provocan abortos e infertilidad y cuando se detectan en un rebaño se imponen restricciones al movimiento de animales y al comercio, ocasionando elevadas pérdidas económicas en las explotaciones pecuarias (Díaz Aparicio, 2013; Ragan *et al.*, 2013; Sherman, 2011). La brucelosis es considerada una de las zoonosis más importantes, que se transmite por contacto directo con los animales y/o con sus secreciones o por el consumo de leche y subproductos lácteos (Acha & Szyfres, 2001; Boschioli *et al.*, 2001). Las especies mencionadas mantienen una preferencia sobre los hospedadores indicados, pero *B. abortus* y *B. suis* se han aislado también de una gran variedad de animales silvestres, como el bisonte *Bison bison*, el alce *Alces alces*, el ciervo *Cervus elaphus*, el cerdo silvestre y el jabalí *Sus scrofa*, el zorro *Vulpes vulpes*, la liebre europea *Lepus europaeus*, búfalo africano *Syncerus caffer*, el reno *Rangifer tarandus tarandus* y el caribú *Rangifer tarandus groenlandicus* (Davis, 1990; Godfroid, 2002; Godfroid *et al.*, 2005; Rementsova, 1987; Rhyan, 2000). Sin embargo, *B. melitensis* ha sido raramente identificada en animales silvestres, aunque al menos en Europa ha sido aislada en gamuza *Rupicapra rupicapra*, íbice *Capra ibex* (Ferroglio *et al.*, 1998; Garin-Bastuji *et al.*, 1990), cabra montés *Capra pyrenaica hispanica* (Muñoz *et al.*, 2010) y ciervo (Blasco, J.M. y Fernández de Luco, D. comunicación personal). Por esta razón, los animales de vida silvestre son considerados por algunos como un posible reservorio de brucelosis para el ganado doméstico (Davis, 1990; Godfroid, 2002; Rementsova, 1987; Rhyan, 2000). Puesto que la brucelosis está siendo controlada con éxito en la mayoría de especies domésticas en países desarrollados, la presencia de *Brucella* en las especies silvestres puede constituir una amenaza para la reinfección de los animales domésticos y el hombre (Davis, 1990; Davis & Elzer, 2002; Olsen, 2013). Sin embargo, la información disponible es controvertida y no se conoce con exactitud el papel que juega la fauna silvestre en los diferentes aspectos de la epidemiología de la enfermedad (Godfroid *et al.*, 2013; Muñoz *et al.*, 2010; White *et al.*, 2013). Un aspecto de suma relevancia que resta por ser clarificado es si la presencia de *Brucella* en la fauna silvestre es una consecuencia de la transmisión de la infección desde los animales domésticos, o bien, se trata de una infección ancestral que se mantiene de

forma autónoma y sostenida en el tiempo. En consecuencia, se precisa de mucha más investigación multidisciplinar para clarificar con precisión la ecología de la brucelosis, y particularmente, para identificar sin ambigüedades si la infección por *Brucella* es sostenible en el tiempo en una determinada población silvestre y poder determinar los factores críticos para el mantenimiento de la misma en dicha población (Godfroid *et al.*, 2013; White *et al.*, 2013). La instauración de la enfermedad en una población susceptible necesita de varios factores que se deben tener en cuenta, como la susceptibilidad o resistencia de los hospedadores a la infección, la dosis infectiva necesaria, el número de individuos, su densidad y el contacto entre ellos, la existencia o no de poblaciones domésticas infectadas, la estacionalidad reproductiva, y la gestión y el manejo que se haga por parte del hombre del medio natural que ocupan los animales (Godfroid, 2002; Godfroid *et al.*, 2010). Todos estos factores influyen de manera relevante en el mantenimiento de la infección por *Brucella* en una población silvestre, y explican que la infección en algunas especies silvestres sea de naturaleza auto limitante y no se mantenga en el tiempo (Rhyan & Spraker, 2010). De hecho, no se conoce de ningún caso en el que las infecciones por *B. abortus* y *B. melitensis* se hayan mantenido de manera autónoma en poblaciones silvestres a lo largo del tiempo en ausencia de efectos antropogénicos importantes (Davis, 1990; Rhyan, 2000). Estos efectos de la intervención humana han contribuido de manera determinante al mantenimiento de la infección por *B. abortus* en bisontes *Bison bison* y wapitíes *Cervus canadensis* en el parque nacional de Yellowstone -PNY- (Etter & Drew, 2006; Godfroid, 2002; Rhyan, 2000). El principal riesgo de infección en las poblaciones silvestres es el contacto con ganado doméstico infectado (Gortázar *et al.*, 2007a). Este hecho fue claramente constatado en Aragón, al aumentar la seroprevalencia en las poblaciones de sarrío *Rupicapra pirenaica pirenaica* en las reservas de caza de Los Valles y Viñamala durante los años 2002 y 2004 (Arnal, 2011), periodo en el que tuvieron lugar importantes brotes de infección en ovejas y vacas que compartían territorio con los sarríos (Gobierno de Aragón, Informes inéditos). Sin embargo, en ausencia de estos efectos, parece improbable que ninguna de estas infecciones haya sido capaz de mantenerse a lo largo del tiempo en las poblaciones silvestres.

Por el contrario, parece claro que determinadas especies (*B. microti* y *B. suis* biovar 2 y biovar 4 en particular) poseen un ciclo epidemiológico silvestre perfectamente establecido (Forbes, 1991; Grégoire *et al.*, 2012; Hubálek *et al.*, 2007; Muñoz *et al.*, 2010;

Pikula *et al.*, 2005; Scholz *et al.*, 2008; Scholz *et al.*, 2009). El auge de las especies cinegéticas en el sector agrícola como actividad económica, que favorecen el contacto entre la fauna silvestre y los animales domésticos, la mayor conciencia y conocimiento de la fauna silvestre, la alimentación y manejo artificial de las poblaciones silvestres y la expansión urbanística hacia los principales hábitats de la vida silvestre, son factores de relevancia a considerar de cara al mantenimiento de la brucelosis en el ganado doméstico y la fauna silvestre (Rhyan, 2000).

Algunos autores han mencionado la posible implicación de los artrópodos hematófagos como vectores de brucelosis, ya que *Brucella* podría conservar su virulencia dentro del artrópodo (Zheludkov & Tsirelson, 2010; Zotova & Balditsina, 1943). Aunque *Brucella* ha sido aislada en varias especies de garrapatas, el papel que pueden jugar estos artrópodos en la epidemiología de la infección es desconocido y púramente especulativo (Rementsova, 1987).

La brucelosis en fauna silvestre no es un fenómeno nuevo y ya en el año 1917 se detectaron reacciones de aglutinación positivas en el bisonte *Bison bison* en el PNY (Mohler, 1917). En el año 1930 en el refugio nacional de caza de Jackson Hole, fueron también detectadas reacciones de aglutinación en wapití *Cervus canadensis* (Murie, 1951). También se detectaron reacciones positivas en cerdos silvestres en 1962 en Hawaii, y en 1963 se obtuvo el primer aislamiento en el caribú, que fue identificado como *B. suis* biovar 4, siendo el agente causal de la denominada “brucelosis rangiferina” (Meyer, 1966). En 1994 se describe por primera vez un aborto producido por *Brucella* en un mamífero marino (Foster *et al.*, 2002; Ross *et al.*, 1994). En Chequia en el año 2007, se aisló *B. microti* del topillo campesino *Microtus arvalis* (Hubálek *et al.*, 2007; Scholz *et al.*, 2008), así como del zorro *Vulpes vulpes* y del suelo (Scholz *et al.*, 2009). Más recientemente, como ya se ha indicado, nuevas cepas de *Brucella*, todavía por ubicar taxonómicamente, han sido aisladas a partir de primates y anfibios (Eisenberg *et al.*, 2012; Fischer *et al.*, 2012; Schlabritz-Loutsevitch *et al.*, 2009).

En la literatura científica son números los estudios de brucelosis realizados en una gran variedad de especies silvestres. Aquí revisaremos brevemente las especies y los casos más relevantes:

2.2.1.- ORDEN: ARTIODACTYLA

2.2.1.1.- Familia: Bovidae

-**Bisonte americano** *Bison bison*. El parque nacional de Yellowstone (PNY) es sin duda uno de los parques nacionales más importante de EE.UU., donde podemos encontrar manadas de bisontes y wapitíes en libertad en los que la infección por *B. abortus* ha constituido un problema controvertido (Kreeger & Olsen, 2002; Olsen, 2010; Rhyan, 2000; Thorne *et al.*, 1991). Las primeras evidencias serológicas en bisontes fueron realizadas en 1917, concluyendo en la hipótesis que la brucelosis fue probablemente introducida en el parque a través de las vacas que usaban los empleados del parque para consumo de leche (Mohler, 1917). En 1930, *B. abortus* fue aislada del epidídimo de un bisonte (Creech, 1930). Actualmente la brucelosis en el PNY muestra una seroprevalencia entre el 40% y 60% (Rhyan *et al.*, 2009; Roffe *et al.*, 1999), siendo *B. abortus* biovar 1 la responsable del problema (Rhyan *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 1993). Los estudios epidemiológicos realizados concluyen que el problema en los bisontes del PNY es muy similar al de cualquier rebaño de vacuno infectado crónicamente, habiéndose descrito abortos, problemas reproductivos, retenciones de placenta y lesiones inflamatorias en los órganos reproductores de bisontes infectados (Rhyan *et al.*, 1994; Rhyan *et al.*, 2001; Rhyan *et al.*, 2009; Roffe *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 1993). Actualmente la brucelosis no se considera una amenaza para la supervivencia del bisonte en el PNY, pero existe el riesgo de transmisión de la infección al ganado vacuno en las zonas adyacentes al PNY, que están libres de la infección (Schumaker, 2013). En la actualidad, la separación temporal y espacial se utiliza para prevenir la transmisión de la brucelosis del bisonte al ganado vacuno (Olsen, 2010; Treanor, 2013).

-**Búfalo cafre** *Syncerus caffer*. El búfalo cafre (también llamado búfalo africano) habita los bosques y sabanas del África subsahariana, especialmente al este del continente. Son diversos los estudios serológicos llevados a cabo en esta especie y en diferentes países, habiéndose identificado una seroprevalencia del 12,5% al 15,1% en el parque Kruger en Sudáfrica mediante técnicas serológicas convencionales como el RBT y CFT (Chaparro *et al.*, 1990), habiéndose confirmado la infección por *B. abortus* biovar 1 en un búfalo (Gradwell *et al.*, 1977). La seroprevalencia identificada en otros países mediante técnicas similares como RBT, SAT y CFT es muy variable: 30% en Tanzania,

(Waghela & Karstad, 1986), 6,5% en Zimbabue (Madsen & Anderson, 1995), y 6% en la República de Botswana, donde solamente se utilizó RBT y FPA (Alexander *et al.*, 2012).

-Eland común *Taurotragus oryx*. Este antilope se encontraba distribuido a lo largo de las sabanas arboladas de África oriental y meridional, pero la expansión humana y las guerras han disminuido drásticamente su número. Sin embargo, el eland común ha sido reintroducido en cotos de caza y fincas ganaderas en el sur de África, Sudáfrica en particular, fuera de su área de distribución natural. Un estudio serológico llevado a cabo mediante técnicas como RBT, SAT y CFT en Zimbawe resultó en una seroprevalencia del 1,4% (Madsen & Anderson; 1995), habiéndose también identificado casos de seropositividad en elands criados en cautividad con cabras (Bell *et al.*, 1977). La seroprevalencia identificada en una finca del sureste de Kenia mediante técnicas similares mostró valores más elevados (Paling *et al.*, 1988).

-Gacelas. Se denomina gacela a cualquiera de las muchas especies de antilopes que componen los generos *Gazella spp.*, *Eudorcas spp.* y *Nanger spp.* Son animales veloces, se encuentran principalmente en los desiertos, praderas y sabanas de África, pero también se encuentran en el suroeste y centro de Asia y el subcontinente indio, viviendo en manadas. Hay muy poca información acerca de la brucelosis en estas especies, pero *B. abortus* fue aislada de una gacella común *Gazella dorcas* en Egipto (Kamel, 1949). *B. melitensis* también ha sido aislada en la gacela de Neumann *Gazella erlangeri*, en animales cautivos en Arabia Saudita que mostraron signos de brucelosis (Omer *et al.*, 2011), también en animales cautivos en Arabia Saudita se encontraron gacelas Idmi *Gazella gazella* seropositivas, pero en este caso no se aisló *Brucella spp.* (Ostrowski *et al.*, 2002).

-Arruí *Ammotragus lervia*. El arruí se distribuye en montañas y terrenos desérticos del norte de África, si bien se han introducido en varios países fuera de África, como en el sureste de España, donde fue introducido en 1970. Que nosotros sepamos no existen estudios en esta especie en África, pero estudios en EE.UU. en arruís introducidos no han detectado casos de positividad (Hampy *et al.*, 1979), como tampoco ha sido el caso de nuestro país (Candela *et al.*, 2009). Estos dos estudios utilizaron el RBT como técnica

diagnostica mientras que otro estudio más completo realizado en España (Muñoz *et al.*, 2010), utilizó un ELISA indirecto validado para rumiantes silvestres. Hasta la fecha no se ha descrito ningún aislamiento de *Brucella* spp. en Arruí.

-Íbice alpino *Capra ibex*. El íbice alpino está presente en la cordillera de los Alpes y se considera susceptible a la infección por *Brucella* (Couturier, 1962), aunque la seroprevalencia en diferentes regiones de arco alpino es prácticamente nula (Giacometti *et al.*, 1995; Marreros *et al.*, 2011; Tolari *et al.*, 1987). Sin embargo *B. melitensis* biovar 2 ha sido aislada de un íbice alpino con orquitis y artritis en Italia (Ferroglia *et al.*, 1998). Esta biovariedad se aislaba con frecuencia en ovejas que compartían pastos con el íbice alpino (Torali & Farina, 1988), aunque se considera bastante improbable la transmisión desde los animales domésticos (Ferroglia *et al.*, 2007). Recientemente (año 2012) en una pequeña reserva de los Alpes se ha puesto en evidencia un importante brote de brucelosis en esta especie, afectando a la mitad de los 24 animales muestreados (Garin-Bastuji, B. comunicación personal). *B. melitensis* biovar 3 fue identificada como responsable del problema, que podría constituir el primero de los casos de una infección por *B. melitensis* mantenida de forma auto-sostenible en la fauna silvestre (la infección fue erradicada de los animales domésticos en esa región francesa en el año 2000), si bien la escasa variabilidad genética de la población afectada y la importante intervención humana en el manejo de la misma (Giacometti *et al.*, 2004), podrían haber influido de manera decisiva en el mantenimiento de la misma (Garin-Bastuji, B. comunicación personal).

-Íbice nubio *Capra ibex nubiana*. Es una subespecie de íbice que habita las montañas desérticas de Egipto, Sudán, Israel, Omán y parte de Arabia Saudí. Un animal que cohabitaba con cabras domésticas infectadas en un espacio cerrado desarrolló orquitis y artritis, asilándose *B. melitensis* biovar 3 (Wazed Ali Mollah & McKinney, 2002).

-Cabra montés *Capra pyrenaica*. La cabra montés es un endemismo de la península ibérica, localizada principalmente por todo el arco montañoso Mediterráneo y la sierra de Gredos. Los estudios serológicos en esta especie han resultado en datos muy

desiguales, probablemente por la diversidad de técnicas utilizadas en cada uno de los trabajos. Por ejemplo, mientras que en la serranía de Cuenca (Martín-Atance & León-Vizcaíno, 2009), Extremadura (García-Moreno *et al.*, 2009) y en la reserva de Tejeda y Almirajara (Santiago-Moreno *et al.*, 2011) no se identificó ningún animal seropositivo, un 25% de las cabras monteses de Cazorla presentaron anticuerpos (León-Vizcaíno, 1991). Otros estudios cifran la seroprevalencia entre el 6% en la población del parque natural Sierra de las Nieves (León-Vizcaíno *et al.*, 1992) y el 3,6% en la reserva de Tejeda y Almirajara (Carvajal *et al.*, 2007). Un estudio llevado a cabo en todas las poblaciones andaluzas cifra una seroprevalencia inferior al 1% (Granados *et al.*, 2001). En un estudio reciente en que se determinó la etiología, prevalencia, distribución espacial y factores de riesgo de brucelosis en varios ungulados ibéricos, la seroprevalencia de la brucelosis en cabra montés resultó en menos del 0,5% en el noreste español, en zonas endémicas de brucelosis en las especies domésticas (Muñoz *et al.*, 2010). *B. melitensis* biovar 1 se aisló del flujo vaginal de una cabra montés con un síndrome depresivo-febril y retención de placenta (León-Vizcaíno *et al.*, 2009). Esta misma biovariedad se identificó en una cabra montés enferma encontrada en la provincia de Albacete (Muñoz *et al.*, 2010), y en otras dos cabras monteses de Andalucía se detectó *B. melitensis* mediante PCR (Cubero-Pablo *et al.*, 2002).

-Gamuza, rebeco y sarrío *Rupicapra* spp. El género *Rupicapra* está presente en algunas cadenas montañosas de Europa, como el Pirineo, la Cordillera Cantábrica, los Apeninos, los Cárpatos, los Alpes, el Cáucaso y ciertas zonas montañosas de los Balcanes, Eslovaquia y Turquía (Weber, 2004). Estudios recientes en el Pirineo aragonés estiman una seroprevalencia inferior al 0,5%, obtenida mediante un iELISA validado para rumiantes silvestres (Muñoz *et al.*, 2010). Esta seroprevalencia tan baja permaneció así incluso en presencia de brotes importantes de *B. melitensis* en las especies domésticas (Arnal, 2011; Muñoz *et al.*, 2010). Pese a ser muy baja, la seroprevalencia encontrada parece ser la mayor del género *Rupicapra*, puesto que en otras especies del género en las que se han realizado estudios serológicos, los resultados han sido negativos (Falconi *et al.* 2010; Gaffuri *et al.*, 2006; Gentile *et al.* 2000; Gibert, 2004;). Sin embargo, en la gamuza alpina se ha descrito un caso de brucelosis de curso crónico con aislamiento de *B. melitensis* biovar 3 en Francia (Garin-Bastuji *et al.*, 1990) y otro con aislamiento de *B.*

abortus biovar 1 en Italia (Ferroglia *et al.*, 2003). Ambos casos estaban relacionados directamente con casos de brucelosis en ganado doméstico.

-**Muflón** *Ovis orientalis*. Su distribución original va desde las islas de Córcega (Francia), Cerdeña (Italia) y Chipre hasta el Cáucaso. A partir del siglo XVIII, el muflón de Córcega se empezó a introducir de forma masiva en la Europa continental y en otros países del mundo (Blanco *et al.*, 1998). En la actualidad hay poblaciones perfectamente asentadas en países europeos, en América del Norte y Oceanía (Rodríguez-Luengo *et al.*, 2002). En España, las poblaciones de muflón se establecen en cotos de caza privados (Santiago-Moreno *et al.*, 2003). Estudios recientes en España, han descartado la presencia de brucelosis en esta especie (López-Olvera *et al.*, 2009; Muñoz *et al.*, 2010), tal y como ha ocurrido en otros países (Aguirre *et al.*, 1992; Hubálek *et al.*, 1993). La mayor parte de las pruebas diagnósticas utilizadas en estos trabajos han sido validadas en ovino doméstico. Puesto que el muflón está estrechamente relacionado con las ovejas domésticas, estas pruebas deberían estar en condiciones de detectar los animales positivos (López-Olvera *et al.*, 2009). La ausencia de animales seropositivos concuerda con anteriores trabajos que indican una baja seroprevalencia en esta especie (Gourreau *et al.*, 1993; Hubálek *et al.*, 1993; León-Vizcaíno *et al.*, 1985), lo que sugiere que el muflón no desempeña un papel importante en la epidemiología de la brucelosis (Cerri *et al.*, 2002).

Otras especies del genero *Ovis* que viven en libertad en América del Norte, como es el caso del muflón de las Rocosas *Ovis canadensis* y del muflón de Dall *Ovis dalli dalli*, han sido sometidas a estudios serológicos mediante técnicas de aglutinación (RBT, SAT), identificando una seroprevalencia del 4% en el muflón de Dall (Foreyt *et al.*, 1983) y del 0,5% en el muflón de las Rocosas (Drew *et al.*, 1992). Estudios serológicos en muflones de las Rocosas han demostrado que la seroprevalencia en esta especie es muy baja o nula (Drew *et al.*, 1992; Turner & Payson, 1982; Zarnke & Yuill, 1981), si bien se ha llegado a aislar *B. abortus* biovar 4 de un grupo de muflones de las Rocosas criados en cautividad, y que mostraron lesiones testiculares. Estos animales se infectaron como resultado de una exposición natural a un feto abortado de ciervo (Kreeger *et al.*, 2004).

-**Órix** *Oryx spp.* El órix u órice de Arabia *Oryx leucoryx* se extinguió en estado salvaje en la década de 1970 y la especie se recuperó mediante un programa de cría en cautividad (Dolan, 1976), reintroduciéndose luego en el medio natural. Se distribuye por

zonas áridas de África como la península arábiga, y también en cotos de caza privados de los estados de Texas y Nuevo México (EE.UU). El órix ha sido domesticado en algunas zonas de África, donde puede convivir con otros animales. Los estudios serológicos realizados en esta especie concluyen en una seroprevalencia por debajo del 1,5% (Greth *et al.*, 1992) y en zonas semiáridas de Kenia en individuos en cautividad se obtuvieron seroprevalencias del 5% (Paling *et al.*, 1988). Se han descrito casos clínicos con orquitis y artritis, aislándose *B. melitensis* biovar 2 en animales en cautividad (Ostrowski *et al.*, 2002).

-**Cobo** *Kobus* spp. El cobo de Lechwe *Kobus leche* es un antílope africano que habita en los humedales de Botswana, Zambia y el sur del Congo y se alimenta de plantas acuáticas. El cobo de Lechwe tiene especial interés epidemiológico por su gran población y el estrecho contacto con el ganado doméstico, lo que explica la elevada seroprevalencia (entre 21,6% y 42,9%) identificada en los diferentes estudios (Muma *et al.*, 2010; Muma *et al.*, 2011; Pandey *et al.*, 1999). Se ha determinado que el cobo de Lechwe puede infectarse fácilmente con *Brucella* spp. una vez puesto en contacto con ganado infectado (Muma *et al.*, 2011). En el cobo de agua *Kubus ellipsiprymnus* se ha descrito el aislamiento de *B. abortus* (Grocock & Staak, 1969).

-**Impala** *Aepyceros melampus*. El área de distribución alcanza a Kenia, Uganda, Tanzania, Zambia, Mozambique, Zimbabue, Botswana, Angola y norte de Namibia. Un estudio serológico mediante la técnica SAT, llevado a cabo en el parque nacional del Serengueti (Tanzania) concluyó en una seroprevalencia muy elevada (31%), y aunque no se observaron lesiones macroscópicas, se aisló *B. melitensis* biovar 1 en un animal (Schiemann & Staak, 1971). Estudios serológicos en Zambia concluyeron en una seroprevalencia del 12,5% (Rottcher, 1978), aunque en Zimbabue se detectó un solo animal seropositivo de 2.068 analizados (Madsen & Anderson, 1995) y ninguno en Namibia (Karesh *et al.*, 1997).

-**Ñu** *Connochaetes* spp. Se distribuye por el África oriental, desde Sudáfrica hasta Kenia y forman grandes rebaños. En el parque nacional de Serengueti, en Tanzania, más de un millón de estos ejemplares migran con los cambios de estaciones en busca de

hierba fresca. Estudios serológicos llevados a cabo en Kenia identificaron una seroprevalencia del 18% (Waghela & Karstad, 1986). Por el contrario, no se han identificado animales positivos en países como Zimbabue, en los que el ñu tiene menor contacto con el ganado doméstico (Madsen & Anderson, 1995).

-Saiga *Saiga tatarica*. Es un antílope migratorio que se encuentra en las estepas de Asia central. Más de 80% de la población total se encuentran en la República de Kazajistán. La brucelosis en el antílope saiga ha sido descrita en varias regiones y confirmada mediante aislamiento de *B. melitensis* (Rementsova, 1987; Zheludkov & Tsirelson, 2010). Durante un brote de brucelosis ovina en Kazajistán, los antílopes saigas que convivían con las ovejas resultaron positivos en serología. De hecho una seroprevalencia del 3,8% ha sido descrita en las poblaciones de saiga de este país (Lundervold, 2001). La infección experimental de los antílopes saiga, reveló que son más sensibles a la brucelosis que el ovino doméstico. Por lo tanto es posible que el saiga pueda infectarse en los pastos utilizados por otros animales domésticos, diseminando la infección en sus migraciones (Rementsova, 1987). Por las características de estos antílopes y su ecología específica, no podría descartarse que la brucelosis pueda haberse mantenido de manera autónoma en esta especie (Zheludkov & Tsirelson, 2010).

2.2.1.2.- Familia: Cervidae

-Alce *Alces alces*. Su área de distribución original se ha reducido mucho debido a la intensa caza, pero todavía quedan unos dos millones de ejemplares repartidos por Norteamérica y Eurasia. La brucelosis en el alce se ha descrito muy pocas veces. Los estudios serológicos sugieren una baja seroprevalencia (Bourque & Higgins, 1984; Hudson *et al.*, 1980; Kocan *et al.*, 1986; Zarnke, 1983), pero *B. abortus* ha sido aislada de alces infectados de manera natural, presentando signos clínicos de la enfermedad y causándoles la muerte (Jellison *et al.*, 1953). Por otro lado, también se han descrito infecciones naturales en alce producidas por *B. suis* biovar 4, infección común en el reno y el caribú de las regiones Árticas, y una de las pocas especies de *Brucella* que presenta un ciclo silvestre específico (Forbes *et al.*, 1996). Existen evidencias experimentales que sugieren que la brucelosis es fatal en los alces, lo que podría explicar la baja

seroprevalencia observada en los diferentes estudios (Dieterich *et al.*, 1991; Jellison *et al.*, 1953; Zarnke, 1983).

-**Corzo** *Capreolus Capreolus*. Se encuentra en la mayor parte de Europa y Asia central (Blanco *et al.*, 1998). Diversos estudios en diferentes regiones de Europa no han puesto en evidencia la existencia de la infección en corzos (Boadella *et al.*, 2010; Gaffuri *et al.*, 2006; Hubálek *et al.*, 1993; McDiarmid & Matthews, 1974; Muñoz *et al.*, 2010). Sin embargo, *B. abortus* fue aislada de lesiones articulares en corzos capturados en Suiza y Alemania (Bouvier, 1964). La baja seroprevalencia en corzo podría explicarse por las particularidades del comportamiento de esta especie, ya que interactúa escasamente con los animales domésticos (Boadella *et al.*, 2010).

-**Mazama (corzuela)** *Mazama* spp. Es un género de venados de los bosques de Suramérica, Centroamérica, México y Trinidad y Tobago. Hay muy poca información acerca de la brucelosis en esta especie, pero en los únicos estudios realizados no se pusieron en evidencia casos positivos (Antunes *et al.*, 2010; Deem *et al.*, 2004).

-**Ciervos odocoileus** *Odocoileus* spp. El género *Odocoileus* los constituyen dos especies, el ciervo de cola blanca *O. virginianus* y el ciervo mulo *O. hemionus*. Son endémicos de la mitad oeste de Estados Unidos, sur de Canadá, México, América central y norte de Sudamérica hasta Perú, Bolivia y Paraguay. Diversos estudios serológicos han determinado que la brucelosis es casi inexistente, encontrado seroprevalencias en torno al 0,05% (Boer *et al.*, 1980; Drew *et al.*, 1992; Johnson *et al.*, 1986a; Jones *et al.*, 1983; Martínez *et al.*, 1999; McCorquodale & DiGiacomo, 1985; Merrell & Wright, 1978; Roug *et al.*, 2012). Esta seroprevalencia tan baja podría ser debida a las técnicas utilizadas, que en la mayoría de estudios serológicos no fueron validadas para este cérvido, pudiendo ocasionar falsos positivos debidos a reacciones cruzas con otros patógenos (Roug *et al.*, 2012). Sin embargo, existen evidencias experimentales que demuestran la infección en ciervo *O. virginianus* tanto por *B. suis* biovar 4 como por *B. abortus* (Qureshi *et al.*, 1999; Youatt & Fay, 1959).

-**Venado de las Pampas** *Ozotoceros bezoarticus*. Es una especie endémica de las llanuras de la región templada de Sudamérica. Antiguamente extendido desde el trópico hasta la Patagonia, a causa de la caza masiva en el siglo XIX y la ocupación de su hábitat por el ganado bovino, hoy habita sólo en áreas aisladas de Brasil, Uruguay y Argentina. En el único estudio realizado con 14 individuos en una reserva en Argentina, ninguno de ellos presentó anticuerpos frente a *Brucella* (Uhart *et al.*, 2003).

-**Reno y caribú** *Rangifer tarandus* spp. El hábitat originario de estas especies son las zonas boreales de tundra y taiga del hemisferio norte, aunque han logrado aclimatarse en las islas subantárticas. El reno y el caribú son los hospedadores primarios de *B. suis* biovar 4 (Forbes, 1991). Dicha infección se localiza principalmente en las articulaciones y el tracto reproductivo, pero otros tejidos también pueden estar infectados (Tessaro & Forbes, 1986). Los signos clínicos de brucelosis en este género son orquitis, abortos y bursitis (Forbes, 1991). La brucelosis producida por *B. suis* biovar 4 ha estado presente históricamente en los rebaños de caribú en Alaska (Neiland *et al.*, 1968). Los nativos del Polo Ártico americano son un grupo de riesgo, ya que pueden adquirir esta infección a través del consumo de carne cruda de caribú (Ferguson, 1997). La prevalencia de la infección por *B. suis* biovar 4 varía de año en año, pero se mantiene de manera autónoma en estas especies en un ciclo epidemiológico muy mal conocido (Zarnke, 2000). Algunos animales silvestres también son susceptibles a *B. suis* biovar 4, como el buey almizclero *Ovibos moschatus*, perteneciente a la familia de los bóvidos (Forbes, 1991; Gates *et al.*, 1984).

-**Ciervo moteado** *Axis axis*. Es propia de Asia y no se han detectado casos de brucelosis (Riemann *et al.*, 1979). Sin embargo, es una especie sensible a la infección experimental (Davis *et al.*, 1984).

-**Ciervo rojo** *Cervus elaphus*. Esta especie consta de numerosas subespecies ampliamente distribuidas por el hemisferio norte. Se han documentado unas 22 subespecies distintas con un área de distribución que se extiende desde el Magreb, la península ibérica y Gran Bretaña hasta gran parte de América del Norte, y que se

diferencian entre sí por el tamaño, longitud y color del pelo y forma de las cuernas. Las seis subespecies de wapitíes norteamericanos, antaño se clasificaban dentro de *Cervus elaphus*, pero actualmente se clasifican como *Cervus canadensis* (Ludt *et al.*, 2004).

En Europa, *Cervus elaphus* parece no tener importancia epidemiológica como reservorio de brucelosis y la seroprevalencia encontrada esta siempre por debajo del 0,5% (Muñoz *et al.*, 2010; Serrano *et al.*, 2011). En ocasiones existe alguna variación anual, pero esta es debida siempre a brotes asociados de brucelosis en ganado doméstico, habiéndose aislado *B. abortus* biovar 1 al menos en España (Muñoz *et al.*, 2010; Serrano *et al.*, 2011). También existen otros casos de brucelosis en ciervos domésticos criados en cautividad, y debidos a *B. abortus* biovar 1 (Her *et al.*, 2010). *B. ovis* ha sido hallada en el esperma de ciervos criados en cautividad en Nueva Zelanda (Bailey, 1997), siendo considerada esta especie como susceptible a la infección por *B. ovis*, que puede llegar a provocarles lesiones testiculares (Ridler *et al.*, 2006; Ridler *et al.*, 2012).

En América del Norte, a principios de 1900, el desarrollo humano había complicado las rutas tradicionales de migración del wapití *Cervus canadensis*, interfiriendo con la cría del ganado doméstico y causando conflictos con los ganaderos. En 1912, el gobierno de los EE.UU. estableció el refugio nacional en Jackson Hole en el estado de Wyoming, donde en 2006 se estimó que 22.000 wapitíes pasaban el invierno en 23 manadas (Maichak *et al.*, 2009). La brucelosis se describió por primera vez en el wapití en 1930 tras el hallazgo de fetos abortados en el mencionado refugio nacional de Jackson Hole (Tunncliffe & Marsh, 1935), sin que se haya podido establecer si esta infección tuvo su origen en algún tipo de transmisión desde el ganado bovino doméstico, o bien se trata de una infección mantenida de manera autónoma en esta especie. En estas zonas existe el riesgo de transmisión de la infección al ganado vacuno (Schumaker, 2013). Los datos obtenidos sugieren que la intervención humana es un factor esencial para el mantenimiento de la enfermedad, ya que la prevalencia de brucelosis en los wapitíes con alimentación artificial es significativamente mayor que en los que no reciben alimentación artificial en invierno (Kreeger & Olsen, 2002; Maichak *et al.*, 2009), lo que parece ser el principal responsable del mantenimiento y transmisión de la brucelosis en el wapití en el área de Yellowstone (Kreeger & Olsen, 2002). Además, los datos sugieren que la seroprevalencia puede estar asociada con la densidad de población de cada manada (Maichak *et al.*, 2009), con la duración de la alimentación artificial (Cross *et al.*, 2007), y con la congregación en manadas entre febrero y junio, que es la época en la que

se producen la mayoría de los abortos inducidos por *Brucella* spp. (Thorne *et al.*, 1991). *B. abortus* es la bacteria responsable de la brucelosis en esta especie (Etter & Drew, 2006).

-Gamo *Dama dama*. El gamo es una especie nativa de la región Mediterránea, pero reintroducida en gran parte de Europa y América, además de Australia y Nueva Zelanda (Blanco *et al.*, 1998). La seroprevalencia encontrada en el gamo en diferentes regiones del mundo ha sido siempre muy baja o nula (Cuteri *et al.*, 1999; Davidson *et al.*, 1985; Giovannini *et al.*, 1988; McDiarmid & Matthews, 1974; Muñoz *et al.*, 2010), y no existen casos de aislamiento de ninguna especie de *Brucella*. Estos resultados sugieren que los gamos no constituyen un reservorio de brucelosis para el ganado doméstico (Muñoz *et al.*, 2010).

-Ciervo acuático chino *Hydropotes inermis*. Es una especie propia de la parte este-central de China y Corea. Son muy pocos los estudios de brucelosis en esta especie, aunque en Corea del Sur se ha descrito una elevada seroprevalencia en esta especie, y además, *B. abortus* biovar 1 se ha aislado como la bacteria responsable (Truong *et al.*, 2011). Estudios con técnicas moleculares relacionan las cepas aisladas en esta especie con las que ocurren habitualmente en el ganado doméstico, por lo que es muy posible que se trate de una infección transmitida desde el ganado doméstico (Kim *et al.*, 2013).

2.2.1.3.- Familia: *Camelidae*

-Camello *Camelus* spp. Es un género de mamíferos denominados popularmente como camellos (dos jorobas) y dromedarios (una joroba), nativos de zonas secas y desérticas de Asia y del norte de África. La infección por *Brucella* puede afectar principalmente al camello *Camelus bactrianus*, especialmente cuando entran en contacto con bovinos y ovinos, aunque también se han registrado casos entre los dromedarios *Camelus dromedarius* (Abbas & Agab, 2002; Kudi *et al.*, 1997). En muchos países en vías de desarrollo de las zonas áridas, tanto el camello como el dromedario son un importante animal de producción para las poblaciones nómadas y el consumo de sus productos como la leche y la carne va en aumento. En consecuencia, la brucelosis puede ser un

problema de importancia en salud pública (Gwida *et al.*, 2012), y podría estar presente en todos los países con cría de camellos, con excepción de Australia (Sprague *et al.*, 2012). El camello y el dromedario son sensibles a las infecciones por *B. melitensis* y *B. abortus* (Gwida *et al.*, 2012).

La brucelosis también se ha descrito en los camélidos de Sudamérica: llama *Lama glama*, guanaco *Lama guanicoe*, vicuña *Vicugna vicugna* y alpaca *Vicugna pacos*, como consecuencia de contactos con rumiantes infectados con *B. abortus* o *B. melitensis* (Abbas & Agab, 2002; Gwida *et al.*, 2012).

2.2.1.4.- Familia: Antilocapridae

-Berrendo o antílope americano *Antilocapra americana*. El berrendo es propio del norte de América, encontrándose desde el sur de Canadá, a través del oeste de los Estados Unidos, hasta el norte de México. Pese a que han sido numerosos los estudios realizados, la brucelosis nunca ha sido puesta en evidencia en esta especie (Dunbar *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 1986b; Kingscote & Bohac, 1986; McCorquodale & DiGiacomo, 1985).

2.2.1.5.- Familia: Suidae

El jabalí y el cerdo doméstico asilvestrado son muy susceptibles a la brucelosis (Algers *et al.*, 2009; Olsen *et al.*, 2012), estando prácticamente presentes de forma natural o introducida en todos los continentes: Eurasia, Australia, Nueva Zelanda, América del Norte, Hawái, América del Sur y numerosas islas de todo el planeta, y poseen una de las áreas de distribución de mayor extensión entre los mamíferos (Oliver, 1993). En algunos lugares en los que no existían, se han introducido jabalíes, que han llegado a hibridarse con los cerdos domésticos asilvestrados, propiciando un crecimiento exponencial de las poblaciones de suidos silvestres. Esto es debido a su elevada plasticidad ecológica y un alto potencial reproductor, lo que sustenta su capacidad de adaptación a diferentes medios que van desde la alta montaña, a los humedales pasando por todo tipo de medios naturales y seminaturales (Herrero, 2002). La infección por *B. suis* ha sido demostrada en jabalí o en cerdo silvestre en la mayoría de los países, tanto de Europa como de América y Australia (Al Dahouk *et al.*, 2005a; Bergagna *et al.*, 2009; Closa-

Sebastià *et al.*, 2010; Cvetnić *et al.*, 2003; De Massis *et al.*, 2012; Garin-Bastuji *et al.*, 2000; Godfroid *et al.*, 1994; Grégoire *et al.*, 2012; Leuenberger *et al.*, 2007; Mason & Fleming, 1999; Muñoz *et al.*, 2010; Ruiz-Fons *et al.*, 2006; Sandfoss *et al.*, 2012; Zygmunt *et al.*, 1982).

La brucelosis suina está causada esencialmente por *Brucella suis*, especie de la que se conocen 5 biovariedades. La biovariedad 4 infecta a renos, caribúes, alces, bisontes, zorros árticos y lobos, mientras que la biovariedad 5 ha sido descrita en roedores en la antigua URSS (Nielsen, 2012). El ganado porcino doméstico o silvestre y el jabalí se infectan principalmente por las biovariedades 1, 2 y 3 de *B. suis* pero también pueden infectarse por *B. abortus* o *B. melitensis* en las zonas donde la brucelosis es enzootica en rumiantes (Algers *et al.*, 2009; Alton, 1990). En Asia y América la brucelosis suina está causada principalmente por las biovariedades 1 y 3, mientras que la biovariedad 2 difiere de ellas en su distribución geográfica (restringida al continente europeo), el rango de hospedadores y su patogenicidad (Godfroid, 2002). Las biovariedades 1 y 3 son muy patógenas para el hombre (Algers *et al.*, 2009), mientras que la biovariedad 2 es muy poco patógena (Algers *et al.*, 2009; Nielsen, 2012), habiéndose aislado esta en muy pocos pacientes (Garin-Bastuji *et al.*, 2006; Lagier *et al.*, 2005; Paton *et al.*, 2001; Teyssou *et al.*, 1989). Cada vez son más los informes que describen la brucelosis en cazadores de jabalí por el contacto con estos animales (Eales *et al.*, 2010; Garin-Bastuji *et al.*, 2006; Giurgiutiu *et al.*, 2009; Irwin *et al.*, 2009; Lagier *et al.*, 2005). *B. suis* ha sido implicada en casos en EE.UU. (Giurgiutiu *et al.*, 2009) y Australia, donde la causa más común de brucelosis humana es la caza recreativa del jabalí (Eales *et al.*, 2010). El jabalí infectado por *B. suis* biovar 2 es considerado como el principal reservorio de la brucelosis para el ganado porcino doméstico en Europa (Cvetnić *et al.*, 2003; Godfroid *et al.*, 2005; Muñoz *et al.*, 2010).

En los EE.UU., *B. suis* se ha erradicado de las poblaciones de cerdos domésticos (Stoffregen *et al.*, 2006), pero las poblaciones de cerdos silvestres del país todavía albergan la infección, que esta producida por las biovariedades 1 y 3 (Edmonds *et al.*, 2001; Godfroid *et al.*, 2011). Las poblaciones de cerdos silvestres están aumentando su distribución, estando presentes en 38 de los 50 estados que componen EE.UU. (Fogarty, 2007). La expansión a nuevas áreas ha sido principalmente causada por un transporte no regulado de cerdos silvestres, con el fin de establecer nuevas poblaciones con fines cinegéticos (Olsen, 2010; Sandfoss *et al.*, 2012).

Las biovariedades 1 y 3 de *B. suis* se han aislado también de cerdos y seres humanos en prácticamente todos los países de América latina (Baumgarten, 2002; Luna-Martínez & Mejía-Terán, 2002; Meirelles-Bartoli *et al.*, 2012; Moreno, 2002; Poester *et al.*, 2002; Samartino, 2002) y de Asia (Algers *et al.*, 2009; Deqiu *et al.* 2002). En Japón, se han puesto en evidencia reacciones serológicas positivas en el jabalí japonés *Sus scrofa leucomystax*, aunque no se llegó a aislar *B. suis* (Watarai *et al.*, 2006). La infección por ambas biovariedades de *B. suis* se considera endémica en cerdos silvestres en Australia (Mason & Fleming, 1999; Robson *et al.*, 1993). La información sobre la situación de la infección por *B. suis* en África es muy escasa (McDermott & Arimi, 2002). Ha sido puesta en evidencia en Egipto, aunque a menudo no es reconocida ni declarada (Refai, 2002).

En Europa, *B. suis* nunca ha sido aislada en Finlandia, Suecia, Noruega y el Reino Unido (Godfroid & Käsbohrer, 2002). Por el contrario, la infección ha sido puesta en evidencia en Alemania, Austria, Bélgica, Croacia, Dinamarca, España, Francia, Italia, República Checa, Rumania, Serbia y Montenegro y Portugal (Algers *et al.*, 2009; Godfroid & Käsbohrer, 2002; Nielsen, 2012). Aunque la infección por *B. suis* biovar 3 se ha descrito también en Croacia, la biovariedad 2 es la más frecuente e importante en Europa (Cvetnić *et al.*, 2005; Francart *et al.*, 1983; Godfroid, 2002; Loulergue *et al.*, 1979). En el caso concreto de *B. suis* biovar 2, el jabalí y la liebre europea son considerados los reservorios de la infección para el ganado doméstico (Algers *et al.*, 2009; Cvetnić *et al.*, 2003; Godfroid *et al.*, 2005; Pikula *et al.*, 2005; Szulowski *et al.*, 1999).

En el cerdo doméstico, la infección por *B. suis* a menudo no causa signos clínicos, haciendo de la brucelosis porcina una enfermedad muy insidiosa, resultando el diagnóstico clínico una tarea difícil. En los casos clínicos, la brucelosis porcina principalmente se caracteriza por abortos, sin embargo, la bacteria también puede afectar a otros órganos, y en particular al tejido óseo y sus articulaciones (Olsen *et al.*, 2012). La enfermedad es considerada como un problema de colectividad, afectando a todos los cerdos igual, aunque la incidencia en adultos es más alta. La transmisión de la enfermedad en los cerdos ocurre tanto por la vía venérea como por la vía oral. *B. suis* puede ser secretada en gran cantidad en el semen y la orina, así como en descargas uterinas y la leche (Alton, 1990). El signo clínico más importante es la infertilidad de las cerdas, con irregularidad de los estros, abortos en cualquier fase de la gestación y el nacimiento de lechones débiles con un alto índice de mortalidad neonatal. En la brucelosis porcina el fracaso reproductivo está acompañado en ocasiones por orquitis en

los verracos y alteraciones ósteo-articulares (Olsen *et al.*, 2012). Aunque las orquitis y las epididimitis sean las lesiones más comunes en los verracos, la infección en ocasiones, puede estar restringida solamente a las glándulas sexuales y no afectar a la fertilidad (Enright, 1990). Sin embargo, estos casos asintomáticos pueden causar la diseminación del patógeno en el semen, potenciando así la transmisión venérea de la infección (Alton, 1990).

B. suis puede infectar también al ganado vacuno, aunque la infección es muy rara (Cook & Noble, 1984; Ewalt *et al.*, 1997; Forbes & Tessaro, 2003; Fretin *et al.*, 2013; Garin-Bastuji & Delcuelleirrie, 2001), y se caracteriza por la eliminación de *B. suis* en la leche, pudiendo representar un riesgo para la salud pública (Ewalt *et al.*, 1997). La infección por *B. suis* biovar 2 es excepcional en ganado bovino (Fretin *et al.*, 2013).

Si bien no han sido descritos casos de infección debidos a *B. suis* biovar 2 en perros, estos pueden infectarse con las biovariedades 1 y 3 de *B. suis*, resultando en abortos y orquitis (Barr *et al.*, 1986; Meirelles-Bartoli *et al.*, 2012; Ramamoorthy *et al.*, 2011).

Los caballos se pueden infectar de forma natural con *B. suis* aunque es más frecuente la infección por *B. abortus* (Cook & Kingston, 1988; Cvetnić *et al.*, 2005; Ocholi *et al.*, 2004). La infección por *B. suis* es muy rara en los pequeños rumiantes (Garin-Bastuji & Delcuelleirrie, 2001; Paolicchi *et al.*, 1993).

La elevada tasa de infección en el jabalí y los cerdos silvestres tanto en Europa, EE.UU. y Australia, representa un riesgo muy importante para la transmisión de la infección a los cerdos domésticos, sobre todo en aquellas explotaciones al aire libre, en sistemas de producción extensivos (Engeman *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2012; Wyckoff *et al.*, 2009), como los sistemas de dehesa típicos del suroeste de España (Muñoz *et al.*, 2003; Muñoz *et al.*, 2010). De hecho, varios brotes de brucelosis porcina se han producido recientemente en nuestro país (Muñoz *et al.*, 2003), que podrían ser explicados por tres factores epidemiológicos relevantes. En primer lugar, existe un aumento considerable del número de jabalíes, pese a que cada año aumenta el número de piezas abatidas (MAAM, 2012). En segundo lugar, nuestro país posee un sistema de cría del cerdo ibérico en extensivo, que facilita los contagios a partir del jabalí (Muñoz *et al.*, 2010). Finalmente, en muchas regiones de España, está aumentando la cría a pleno aire del porcino, debido a una mayor demanda por parte del mercado de carne de calidad o productos cárnicos

de tipo orgánico. Este sistema de cria permite los contactos con el jabalí, y por tanto, facilita el contagio.

2.2.1.6.- Familia: *Tayassuidae*

-**Pecarí** *Tayassu pecari*. Es una especie de suido ampliamente dispersada desde la América tropical hasta la subtropical, desde el sudoeste de EE.UU. hasta el norte de Argentina en Sudamérica. Este género aunque menos estudiado que el género *Sus*, también puede ser infectado por *B. suis*. Un estudio realizado en Venezuela mostró una alta seroprevalencia, así como un elevado número de aislamientos de *B. suis* biovar 1 (Lord & Lord, 1991). La situación parece ser similar en Brasil (Mayor *et al.*, 2006). Sin embargo la infección en pecaríes libres no ha sido puesta en evidencia en EE.UU. (Corn *et al.*, 1987; Gruver & Guthrie, 1996).

2.2.2.- ORDEN: LAGOMORPHA

El orden *Lagomorpha* está compuesto por dos familias, *Ochotonidae* (pikas) y *Leporidae* (conejos y liebres). Dentro de este orden, la liebre europea *Lepus europaeus* se considera un hospedador natural de brucelosis, a diferencia del conejo *Oryctolagus cuniculus* (Thorne, 2001). Sin embargo, aunque no se ha descrito ningún caso de infección natural, los conejos son sensibles a la infección experimental por *B. suis* biovar 1 (Fort *et al.*, 2012; Stěrba, 1984). La brucelosis ha sido demostrada en otras especies de lagomorfos como la liebre de montaña *Lepus timidus*, la liebre de California *Lepus californicus* y en el conejo del desierto *Sylvilagus audubonii* (Thorne, 2001). Una cepa de *B. suis* se aisló de una liebre de California *Lepus californicus* en el estado de Utah, EE.UU., además se encontraron varias liebres seropositivas frente a *Brucella* spp. (Thorpe *et al.*, 1965).

En Europa, la brucelosis de la liebre producida por *B. suis* se describió por vez primera en Alemania y posteriormente en Dinamarca, Francia, Polonia, Suiza y la antigua Checoslovaquia (Algers *et al.*, 2009; Rementsova, 1987). En Dinamarca, se identificó el primer caso en 1951 y debido a las relaciones epidemiológicas con los brotes de brucelosis porcina se comenzó a estudiar la posible implicación de la liebre europea. En 1954 se encontraron liebres seropositivas, aislándose *B. suis* de las lesiones típicas,

considerando estas como una posible fuente de infección para el cerdo doméstico a través de la alimentación con despojos de liebres cazadas infectadas o mediante la contaminación de los pastos (Bendtsen *et al.*, 1956). Actualmente se dispone de escasa información acerca de la prevalencia de brucelosis en la liebre europea, aunque estudios anteriores en países del centro de Europa la han estimado entre el 3% y 10% (Rementsova, 1987). La infección en la liebre se localiza principalmente en los órganos internos como el bazo, el hígado, los linfonodos regionales y órganos reproductores, generando nódulos de diferentes tamaños (Gyuranecz *et al.*, 2011; Vítovec *et al.*, 1976). La infección en esta especie animal ha sido descrita en diferentes países europeos, habiéndose identificado *B. suis* biovar 2 como el responsable del problema en Europa (Gyuranecz *et al.*, 2011; Lavín *et al.*, 2006; Quaranta *et al.*, 1995; Trembl *et al.*, 2007; Szulowski *et al.*, 1999). De hecho, la liebre europea es considerada también, además del jabalí, como el reservorio principal de la infección por *B. suis* biovar 2 (Godfroid *et al.*, 1994; Pikula *et al.*, 2005). La brucelosis en la liebre europea también ha sido descrita en Argentina, en este caso producida por *B. suis* biovar 1 (Fort *et al.*, 2006; Szyfres *et al.*, 1968). Mientras que la brucelosis en la liebre europea ha sido puesta en evidencia en diferentes países, nunca se ha diagnosticado ni en la liebre ibérica *Lepus granatensis* ni en la liebre de piornal *Lepus castroviejoi*, ambas presentes en la península ibérica (Alzaga, 2010; Revilla *et al.*, 2006; Rodríguez Alonso *et al.*, 1997).

2.2.3.- ORDEN: CARNIVORA

El orden *Carnivora* presenta una elevada diversidad de tamaños entre sus integrantes, en su mayoría terrestres. Los carnívoros en su mayor parte son depredadores y esta acción ofrece muchas oportunidades para el contagio de la brucelosis (Neiland, 1970). La presencia de anticuerpos frente a *Brucella* en los carnívoros silvestres, como cánidos y úrsidos ha sido bien documentada en prácticamente todos los continentes (Davis, 1990). Se han descrito evidencias serológicas de infección en el lobo *Canis lupus*, oso grizzly *Ursus arctos horribilis*, zorro ártico *Alopex lagopus* y zorro rojo *Vulpes vulpes* en las regiones Árticas, seguramente por la ingestión de renos infectados por *B. suis* biovar 4 (Neiland, 1970; Neiland, 1975; Rementsova, 1987). El lobo y el oso negro *Ursus americanus* son sensibles a la infección experimental por *B. suis* biovar 4 (Neiland & Miller, 1981). También el coyote *Canis latrans* puede infectarse por *B. abortus*

biovar 1 y esta infección puede ser transmitida congénitamente (Davis *et al.*, 1979). Curiosamente, pese a la relativamente elevada prevalencia de brucelosis en bisontes y wapitíes en el PNY, no se han detectado evidencias serológicas de infección en coyotes en el PNY (Gese *et al.*, 1997).

Se han descrito evidencias serológicas de infección en zorros en Irlanda del Norte y Gales, donde la brucelosis era endémica en el ganado vacuno, habiéndose llegado a aislar *B. abortus* biovar 1 en zorros (Davies *et al.*, 1973; McCaughey, 1968). En Argentina, dos especies de zorros silvestres, zorro de la pampa *Lycalopex gymnocercus* y zorro gris *Lycalopex griseus*, pueden estar infectadas naturalmente por *B. abortus* biovar 1 (Szyfres & González Tomé, 1968).

B. abortus biovar 1 ha sido aislada en mapache *Procyon lotor* posiblemente como consecuencia de ingerir fetos abortados o placentas de bovinos domésticos infectados (Swann *et al.*, 1980). En Tanzania, el chacal de lomo negro *Canis mesomelas* y la hiena manchada *Crocuta crocuta* pueden presentar anticuerpos frente a *Brucella* spp. (Sachs & Staak, 1968).

Se han descrito brotes de brucelosis en explotaciones de visón americano *Neovison vison* alimentados con material contaminado, aislándose *B. abortus* en estos animales. La infección se caracterizó por el elevado número de abortos (Prichard *et al.*, 1971; Rementsova, 1987).

El oso es el mayor depredador en los ecosistemas que ocupa y también está expuesto a la infección por *Brucella* spp. No se han descrito infecciones naturales por *Brucella* spp. en las tres especies de osos más estudiadas, pero varios estudios han puesto en evidencia la presencia de anticuerpos en estos animales (Drew *et al.*, 1992; Rah *et al.*, 2005; Tryland *et al.*, 2001; Zarnke *et al.*, 2006).

Independientemente de que muchos de los estudios anteriores pueden carecer de valor por haberse basado en pruebas diagnósticas no validadas para la correspondiente especie en estudio, la hipótesis más aceptada es que los carnívoros silvestres se infectan a través del consumo de los fetos abortados, placentas y otros tejidos de animales domésticos o silvestres infectados. Por otro lado, se acepta también que los carnívoros silvestres no juegan un papel importante en la epidemiología de la brucelosis, y podrían considerarse centinelas para detectar la presencia de la misma en las especies domésticas

(Davis, 1990; Tryland *et al.*, 2001). Sin embargo, ambas hipótesis son excesivamente simplistas y la epidemiología de la brucelosis en carnívoros debería ser objeto de estudios adicionales para clarificarla. De hecho, una especie del género *Brucella* (*B. canis*) es específica de los canidos y se han encontrado evidencias serológicas de que esta infección puede existir en diferentes carnívoros silvestres, como el coyote *Canis latrans* (Randhawa *et al.*, 1977) y el zorro kit *Vulpes macrotis* (McCue & O'Farrell, 1988). Por otro lado, el reciente aislamiento de *B. microti* en zorros *Vulpes vulpes* (Scholz *et al.*, 2009), añade nuevos interrogantes a la epidemiología de la infección por *Brucella* spp. en carnívoros y otras especies silvestres, que deberían ser clarificados en los próximos años.

El perro *Canis lupus familiaris* es sensible a la infección y cuatro de las especies del género (*B. abortus*, *B. canis*, *B. melitensis* y *B. suis*) han sido aisladas en esta especie doméstica (Carmichael, 1990; Hollett, 2006; Wanke, 2004). La brucelosis canina está causada de modo primario por *B. canis*, una especie rugosa, que no ha sido nunca aislada en otros animales domésticos o silvestres (Davis, 1990; Carmichael, 1990), aunque sí afecta a la especie humana (Carmichael, 1990; Lucero *et al.*, 2005; Lucero *et al.*, 2010). En el coyote y el zorro kit se han detectado evidencias serológicas (McCue & O'Farrell, 1988; Randhawa *et al.*, 1977), pero *B. canis* nunca se ha aislado en animales silvestres (Davis, 1990; Carmichael, 1990). Por el contrario, las otras 3 especies lisas de *Brucella* mencionadas afectan al perro, causándole una infección que es considerada como esporádica y autolimitante (Carmichael, 1990; Forbes, 1990; Hollett, 2006; Wanke, 2004). La mayoría de las infecciones se adquieren a través de la ingestión de carne, leche, membranas fetales, fetos abortados y tejidos de otros animales domésticos infectados (Baek *et al.*, 2003; Barr *et al.*, 1986; Davis *et al.*, 1988; Forbes, 1990; Neiland, 1970; Ramamoorthy *et al.*, 2011; Woldemeskel, 2013). Aunque se han descrito casos de transmisión horizontal y vertical de brucelosis entre perros (Bicknell *et al.*, 1976; Forbes, 1990; Pidgeon *et al.*, 1987), y que la infección por *B. suis* en un perro ha sido considerada como fuente de infección para el ganado porcino (Körmendy & Nagy, 1982). Los perros de granja no se consideran un reservorio importante de brucelosis para las especies domésticas (Baek *et al.*, 2003; Ferney, 1987; Meirelles-Bartoli *et al.*, 2012; Prior, 1976). Recientemente se ha confirmado en EE.UU. la infección de perros de caza al exponerse a cerdos silvestres infectados por *B. suis* biovar 1, bacteria que fue aislada en dos perros de caza a partir de muestras de testículos (Ramamoorthy *et al.*, 2011). También se han encontrado perros de caza seropositivos con lesiones testiculares en el estado australiano

de Nueva Gales del Sur (Moloney, 2012). Sin embargo, la existencia de brucelosis en perros de caza es ampliamente desconocida, particularmente en nuestro país.

2.2.4.- ORDEN: RODENTIA

El orden *Rodentia* presenta el mayor número de especies distintas dentro de los mamíferos. En el mundo se han descrito más de 20 especies de roedores silvestres susceptibles a la infección por *Brucella* (Thorne, 2001). En el estado de Utah -EE.UU.- (Thorpe *et al.*, 1965), en la zona del Cáucaso (Vershilova *et al.*, 1983) y en la antigua URSS se han aislado cepas de *Brucella* en roedores (Rementsova, 1987). Anticuerpos frente a *Brucella* han sido identificados en capibaras *Hydrochoerus hydrochaeris* y ratas *Rattus norvegicus* (Davis, 1990; García-Carrillo, 1990; Lord & Flores, 1983; Meyer, 1974). Las ratas son relativamente resistentes a la infección por *Brucella* y necesitan una elevada dosis para sufrir una infección generalizada (García-Carrillo, 1990). *B. melitensis* ha sido aislada a partir de ratas *Rattus norvegicus* capturadas en las cercanías de explotaciones de cabras infectadas en el momento del parto (Renoux, 1960). Mediante infección experimental se demostró que la ardilla de Richardson *Spermophilus richardsonii* es sensible a la infección por ingestión de cepas vacunales y de campo de *B. abortus* (Nol *et al.*, 2009). La brucelosis en roedores silvestres ha sido considerada como una infección autolimitante asociada a animales que cohabitan con ganado doméstico infectado (Meyer, 1974). Sin embargo, esta es una interpretación excesivamente simplista, y la epidemiología de la infección por *Brucella* en roedores silvestres no se ha determinado con suficiente precisión y debería ser objeto de investigación. De hecho, varias especies de *Brucella* parecen adaptadas específicamente a los roedores: *B. neotomae*, que fue aislada de la rata de la madera del desierto *Neotoma lepida* en Utah (Stoenner & Lackman, 1957), *B. microti*, aislada recientemente del topillo campesino *Microtus arvalis* y también aislada de zorros *Vulpes vulpes* (Hubálek *et al.*, 2007; Scholz *et al.*, 2008; Scholz *et al.*, 2009) y *B. suis* biovar 5, que fue aislada en roedores en zonas de la antigua URSS (Vershilova *et al.*, 1983).

2.2.5.- MAMIFEROS MARINOS

Los mamíferos marinos que viven en un ambiente acuático se engloban dentro del orden *Cetacea* y del orden *Carnivora* (Superfamilia: *Pinnipedia*). Se han identificado infecciones por *Brucella* spp. en focas *Phoca* spp., leones y lobos marinos (familia *Otariidae*), morsa *Odobenus rosmarus*, delfines (familia *Delphinidae*), marsopas (familia *Phocaenidae*) y ballenas (familia *Balaenidae*). Las cepas de *Brucella* (inicialmente denominadas como *B. maris*) fueron aisladas de mamíferos marinos por vez primera en 1994 (Ross *et al.*, 1994). Una vez mejor estudiada esta infección en los mamíferos marinos, dos nuevas especies fueron incorporadas al género: *B. ceti* y *B. pinnipedialis*, siendo los cetáceos y los pinnípedos sus hospedadores preferenciales, respectivamente (Foster *et al.*, 2007). Desde entonces *Brucella* spp. ha sido aislada en numerosas especies de mamíferos marinos como foca común *Phoca vitulina*, foca anillada *Phoca hispida*, foca arpa *Phoca groenlandica*, foca de casco *Cystophora cristata*, foca gris *Halichoerus grypus*, marsopa común *Phocoena phocoena*, delfín común de pico corto *Delphinus delphis*, delfín listado *Stenella coeruleoalba*, delfín mular *Tursiops truncatus*, delfín del Atlántico *Lagenorhynchus acutus*, delfín de hocico blanco *Lagenorhynchus albirostris*, delfín de Maui *Cephalorhynchus hectori maui*, delfín de cabeza blanca *Cephalorhynchus hectori*, ballena minke *Balaenoptera acutorostrata* (Alba *et al.*, 2013; Davison *et al.*, 2013; Forbes *et al.*, 2000; Foster *et al.*, 2002; Guzmán-Verri *et al.*, 2012; Hernández-Mora *et al.*, 2008; Hernández-Mora *et al.*, 2013; Muñoz *et al.*, 2006), demostrándose claramente que la brucelosis está ampliamente diseminada en las poblaciones de mamíferos marinos. De hecho, se han encontrado animales infectados en la práctica totalidad de mares y océanos (Guzmán-Verri *et al.*, 2012; Hernández-Mora *et al.*, 2013). Los mecanismos de transmisión de *Brucella* en los mamíferos marinos son poco conocidos, pero podrían ser muy similares a las de los mamíferos terrestres (Hernández-Mora *et al.*, 2013), si bien no es descartable que puedan existir vectores intermediarios, como algunos parásitos (Dawson *et al.*, 2008; Perrett *et al.*, 2004). Son necesarios más estudios para entender el papel epidemiológico que juegan estas especies de *Brucella* en los ecosistemas marinos y clarificar sus implicaciones en las poblaciones de cetáceos y pinnípedos. Como signos clínicos y lesiones *post-mortem* remarcables, en los cetáceos infectados por *Brucella* spp. se ha descrito una elevada proporción de lesiones neurológicas como meningoencefalitis y discoespondilitis espinal, así como orquitis purulenta, abscesos subcutáneos, placentitis, abortos, epididimitis, linfadenitis y mastitis (Davison *et al.*, 2013; Foster *et al.*, 2002; González-

Barrientos *et al.*, 2010; Hernández-Mora *et al.*, 2008). Se han descrito muy pocas infecciones por estas cepas de mamíferos marinos en la especie humana, por lo que estas infecciones podrían ser poco frecuentes o bien, por el contrario, estar largamente infra-diagnosticadas (Brew *et al.*, 1999; Sohn *et al.*, 2003; Whatmore *et al.*, 2008). Las infecciones en seres humanos causadas por cepas de mamíferos marinos pueden asemejarse a las provocadas por cepas terrestres, ya que la mayoría de especies de *Brucella* causan síndromes similares (Pappas, 2010; Whatmore *et al.*, 2008).

2.3.- ESTRATEGIAS DE DIAGNÓSTICO DE LA BRUCELOSIS Y SU APLICACIÓN A LOS ESTUDIOS DE FAUNA SILVESTRE

Puesto que no existen signos clínicos claramente específicos de las infecciones por *Brucella* en los distintos huéspedes que parasitan, su diagnóstico se asienta en el uso de pruebas de laboratorio que pueden clasificarse en directas e indirectas. Las directas se basan en el aislamiento y la identificación bacteriológica del agente causal, mientras que las pruebas indirectas están basadas en la demostración de una respuesta inmune específica por parte del huésped tras la infección (Blasco, 2002; Godfroid *et al.*, 2010).

Las **pruebas diagnósticas directas** se basan pues en evidenciar la presencia de *Brucella* en los animales/muestras sospechosas, y su principal limitación radica en su elevado coste (económico y en tiempo), su relativa complejidad y peligrosidad (Alton *et al.*, 1988; McGiven, 2013), y su relativamente baja sensibilidad. Por estas razones no pueden recomendarse como pruebas individuales de diagnóstico en las campañas de erradicación realizadas en grandes poblaciones, quedando restringido su uso a la confirmación eventual de los brotes. La tinción de frotis de material patológico con coloraciones especiales como la de Stamp puede proporcionar alguna información diagnóstica útil, aunque solamente tiene valor presuntivo por su baja sensibilidad y porque otros agentes patógenos como *Coxiella burnetii* y *Chlamydia abortus* poseen morfología y características tintoriales similares (Alton *et al.*, 1988). Por ello, para el diagnóstico definitivo de la enfermedad se debe recurrir al aislamiento bacteriológico directo (Alton *et al.*, 1988; Nielsen, 2012), o bien a la detección de ADN específico mediante PCR (Bricker, 2002; Yu & Nielsen, 2010).

El ADN de *Brucella* puede ponerse en evidencia de manera específica a través de diversas técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa -PCR- (Bricker,

2002), por lo que esta técnica puede ser aplicada directamente al diagnóstico de la brucelosis. Esto puede hacerse extrayendo ADN de *Brucella* directamente de los tejidos de animales sospechosos (Amin *et al.*, 2001; Hinić *et al.*, 2009; Leyla *et al.*, 2003; Marianelli *et al.*, 2008; Romero *et al.*, 1995). De hecho, la extracción de ADN desde secreciones y muestras tisulares y su amplificación por PCR es considerada por algunos como la mejor opción (más sensible) que la bacteriología convencional para el diagnóstico directo de la brucelosis. Así, diversas PCRs han sido desarrolladas para el diagnóstico directo de la brucelosis a partir de tejidos de fetos abortados, sangre, leche y semen (Bricker, 2002; Cortez *et al.*, 2001; Fekete *et al.*, 1992; Hinić *et al.*, 2009; Ilhan *et al.*, 2007; Ilhan *et al.*, 2008; Leal-Klevezas *et al.*, 1995; Manterola *et al.*, 2003; Romero *et al.*, 1995; Yu & Nielsen, 2010). La gran ventaja de estas técnicas es que pueden proporcionar resultados más rápidamente que los cultivos bacteriológicos convencionales y requieren solo de unas mínimas condiciones de bioseguridad (Yu & Nielsen, 2010). Por el contrario, precisan un equipamiento específico bastante costoso, y requieren personal experimentado e instalaciones adecuadas para evitar problemas (frecuentes) de contaminaciones cruzadas. El desarrollo ocurrido en los años recientes en materia de pruebas moleculares aplicadas al diagnóstico de brucelosis ha sido muy importante, habiéndose identificado herramientas adecuadas (Bricker, 2002; Vizcaíno *et al.*, 1997), y este proceso se ha acelerado con la secuenciación genómica de varias especies de *Brucella* (Halling *et al.*, 2005; Wattam *et al.*, 2009). Las técnicas más utilizadas se basan en la detección de secuencias específicas de genes de *Brucella* como el gen 16S ARNr, la secuencia de inserción IS711, el gen *bcs*p31 y el gen *omp*2 (Baddour & Alkhalifa, 2008; Yu & Nielsen, 2010). La sensibilidad se incrementa utilizando secuencias de varios genes (Mukherjee *et al.*, 2007; Yu & Nielsen, 2010). La preparación de la muestra es clave para la eficacia diagnóstica, ya que la mayoría de las muestras de campo contienen inhibidores de la PCR (Bricker, 2002). Cada tipo de muestra clínica tiene sus dificultades inherentes y además, el método de extracción del ADN puede influir también en la sensibilidad final obtenida (Dauphin *et al.*, 2009). En consecuencia, el rendimiento de las técnicas moleculares para el diagnóstico directo de la brucelosis a partir de muestras tisulares de campo debe mejorarse considerablemente y hasta el momento, ninguna de las técnicas basadas en la detección directa de ADN de *Brucella* mediante PCR en los tejidos se ha mostrado más sensible que la bacteriología convencional (Bricker, 2002; Leyla *et al.*, 2003; Manterola *et al.*, 2003; Marianelli *et al.*, 2008; Romero *et al.*, 1995).

El aislamiento bacteriológico es, actualmente, la prueba más sensible y específica para el diagnóstico directo de la infección por *Brucella* spp. tanto en el ganado doméstico como en la fauna silvestre (Godfried, 2002; Godfried *et al.*, 2010; Godfried *et al.*, 2013). Además, el aislamiento bacteriano es siempre necesario para la identificación y tipificación de las diferentes biovariedades de *Brucella*. Sin embargo, dicho aislamiento bacteriológico es complicado, caro y necesita tiempo y muchos recursos, incluyendo instalaciones de bioseguridad adecuadas y personal cualificado para manipular las muestras (Nielsen, 2012). La manipulación de cepas vivas de *Brucella* implica un riesgo de infección y requiere unas estrictas normas de bioseguridad (Fiori *et al.*, 2000; Noviello *et al.*, 2004; Yagupsky & Baron, 2005). Para que este diagnóstico resulte efectivo se requieren muestras y medios de cultivo adecuados. Las muestras más adecuadas para el diagnóstico directo de la enfermedad, tanto de animales vivos como tras la necropsia de los mismos, han sido descritas con bastante precisión (Alton *et al.*, 1988; de Miguel *et al.*, 2011; Marín *et al.*, 1996a; Nielsen, 2012). La eficacia diagnóstica del cultivo dependerá directamente de la calidad y cantidad de estas muestras, así como de la calidad de los medios y procedimientos de cultivo utilizados (Marín *et al.*, 1996a; Marín *et al.*, 1996b; de Miguel *et al.*, 2011). Para obtener la mejor sensibilidad diagnóstica, las muestras una vez descontaminadas y homogenizadas, deben cultivarse directamente en medios selectivos. El uso simultáneo del medio de Farrell -MF- (Farrell *et al.*, 1974) y el medio Thayer-Martin modificado -mTM- (Marín *et al.*, 1996a) estaba considerado como la combinación de elección para el aislamiento de *Brucella* a partir de muestras de campo contaminadas (Nielsen, 2012). Sin embargo, ha sido demostrado recientemente que el medio CITA es más sensible que los medios Farrell y Thayer-Martin modificado para el aislamiento de todas las especies de *Brucella* a partir de muestras de campo contaminadas, si bien la combinación de resultados obtenidos en el medio CITA y en el de Farrell, resulta en la máxima sensibilidad diagnóstica (de Miguel *et al.*, 2011).

Una vez identificada la bacteria como *Brucella* spp. (Nielsen, 2012) es sumamente importante su tipificación como especie y biovariedad, ya que esto constituye una valiosa información epidemiológica (Adone & Pasquali, 2013). Las técnicas de tipificación convencionales son muy útiles ya que permiten identificar los aislamientos a nivel de especie y biovariedad (Alton *et al.*, 1988). Algunas de las técnicas moleculares permiten solo la identificación como especie, y en algunos casos -pero no en todos- también como biovariedad. Además, a diferencia de los métodos convencionales,

algunas técnicas moleculares permiten establecer relaciones filogenéticas y epidemiológicas entre cepas. Para ello, se han desarrollado una serie de técnicas moleculares empleando diversas secuencias genéticas, como el elemento IS711, capaces de identificar la mayoría de especies de *Brucella*. La técnica más utilizada inicialmente era la denominada AMOS-PCR, debido a las especies de *Brucella* que permitía identificar *B. abortus* biovar 1, 2 y 4, *B. melitensis*, *B. ovis* y *B. suis* biovar 1- (Bricker & Halling, 1994). Esta técnica fue modificada posteriormente para poder identificar también las cepas vacunales S19 y RB51 (Bricker & Halling, 1995). Algunas modificaciones posteriores de esta técnica mejoraron su rendimiento (Bricker, 2002; Ewalt & Bricker, 2003; Ocampo-Sosa *et al.*, 2005), pero no es capaz de identificar ni todas las especies del género, ni todas las biovariedades de algunas especies. La disponibilidad de información acerca del genoma de *Brucella* permitió el desarrollo de una nueva generación de técnicas de PCR multiplex con mayor precisión y rendimiento. De entre ellas, la más utilizada es la denominada *-Bruce ladder-*, una técnica de tipo PCR multiplex capaz de diferenciar las seis especies clásicas, así como también las especies de *Brucella* aisladas en mamíferos marinos, y las cepas vacunales *B. abortus* RB51 y S19 y *B. melitensis* Rev. 1 (García-Yoldi *et al.*, 2006). Durante su validación se demostró que la técnica era muy eficaz, con la notable excepción de *B. canis*, ya que prácticamente la mitad de las cepas examinadas de esta especie fueron erróneamente identificadas como *B. suis* (López-Goñi *et al.*, 2008). Una modificación ulterior de esta PCR multiplex denominada *-Suis ladder-*, elimina los problemas mencionados en la identificación de *B. canis* y, además, permite la diferenciación de las 5 biovariedades de *B. suis* (López-Goñi *et al.*, 2011). Pese a ello, esta última modificación de la técnica no permite la diferenciación de las biovariedades de *B. abortus* y *B. melitensis*.

Una técnica usada también para la caracterización de cepas de *Brucella* esta basada en el estudio de los fragmentos de restricción (RFLP) tras amplificación mediante PCR de determinados genes de *Brucella* (Al Dahouk *et al.*, 2005b; Bricker, 2002; Cloeckaert *et al.*, 1995; Ficht *et al.*, 1989; Ficht *et al.*, 1990; Ficht *et al.*, 1996; García-Yoldi *et al.*, 2005; Vizcaíno *et al.*, 1997). El estudio mediante PCR-RFLP de los genes *Omp31*, *Omp2a* y *Omp2b* (Cloeckaert *et al.*, 1995; Vizcaíno *et al.*, 1997) ha resultado particularmente útil para identificar los principales haplotipos de *B. suis* biovar 2 presentes en Europa (Ferrão-Beck *et al.*, 2006; Muñoz *et al.*, 2010).

Las **pruebas diagnósticas indirectas** se basan en la detección de anticuerpos en pruebas serológicas o bien en la detección de la respuesta inmune mediada por células. Las pruebas indirectas son rápidas y relativamente sencillas de realizar, pudiendo analizarse un elevado número de muestras, por lo que son las más utilizadas para el estudio y seguimiento de grandes poblaciones (Godfroid *et al.*, 2013). Es importante destacar que existen diversas bacterias Gram-negativas que comparten epitopos comunes con *Brucella* situados en la cadena O de sus respectivos LPSs (*Yersinia enterocolitica* serotipo O:9, *Salmonella* del grupo N [O:30], *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* O:157 y otras), que causan reacciones serológicas positivas falsas (Corbel, 1985; Kittelberger *et al.*, 1995; MacMillan, 1990; Moriyón & López-Goñi, 2002) y que, en consecuencia, provocan importantísimos problemas de especificidad en las pruebas serológicas (Jungersen *et al.*, 2006; Mittal *et al.*, 1985; Nielsen *et al.*, 2004). En estos casos de reacciones cruzadas tan solo la aplicación de pruebas diagnósticas de inmunidad celular permiten la diferenciación entre las reacciones provocadas por la brucelosis y las debidas a estas bacterias (Algers *et al.*, 2009; Nielsen, 2012). La prueba más usada para esta finalidad es la conocida como prueba de la *brucellina* (brucellin skin test), y que está basada en la inoculación *in vivo* de un extracto proteico citosólico de *Brucella* para poner en evidencia una reacción de hipersensibilidad retardada (Pouillot *et al.*, 1997; Saergerman *et al.*, 1999). Existen también otros métodos de detección de la respuesta inmune mediada por células, como por ejemplo la detección de IFN- γ (Riber & Jungersen, 2007), pero ninguna de estas técnicas ha sido aplicada al diagnóstico de rutina.

La forma en que se presentan los antígenos bacterianos condiciona su reconocimiento o accesibilidad a los sistemas receptores y efectores del hospedador. Por esta razón, para entender las pruebas diagnósticas hay que considerar el tipo de antígeno utilizado y su localización celular. En consecuencia, las pruebas serológicas pueden ser divididas en dos grandes grupos: las que emplean bacterias íntegras como antígenos y aquellas otras que emplean extractos solubles o antígenos purificados (Nielsen, 2002). El primer grupo de pruebas incluyen esencialmente las aglutinaciones en placa o en tubo (SAT), la aglutinación a pH ácido -rosa de Bengala- (RBT), la prueba del anillo en leche (Ring test), y la prueba de fijación del complemento (CFT). Como antígeno en estas pruebas se usan suspensiones de brucelas en fase S, lo que significa que desde el punto de vista práctico, los únicos anticuerpos detectados son aquellos generados frente a las

cadenas polisacáridicas (O/PS) del LPS y del NH, sin que las proteínas de membrana, y menos aún las citosólicas, intervengan en las mismas. Igualmente, se entiende que estas pruebas de aglutinación que usan células S íntegras como antígeno no sean útiles para el diagnóstico de las infecciones producidas por especies R (Blasco, 1990; Carmichael, 1990). El objetivo de la prueba de la seroaglutinación lenta en tubo (SAT) es detectar principalmente anticuerpos de los isotipos IgM e IgG aglutinantes dirigidos frente *Brucella* spp. A la concentración óptima de antígeno y anticuerpos se forman complejos antígeno-anticuerpo que aglutinan en la parte inferior del tubo de ensayo. Esta reacción es lenta ya que requiere de una incubación durante una noche a 37°C (MacMillan, 1990). Debido a la presencia en el suero normal de anticuerpos del isotipo IgM que producen aglutinaciones inespecíficas, la prueba de SAT produce muchos resultados positivos falsos (Nielsen, 2002). La prueba de rosa de Bengala (RBT) utiliza antígeno coloreado con rosa de Bengala y tamponado a pH bajo, normalmente $3,65 \pm 0,05$ (Angus & Barton, 1984; Davies, 1971; Morgan *et al.*, 1969). Este pH bajo impide que algunas IgM aglutinen inespecíficamente y favorece la aglutinación de IgG1, reduciendo de este modo las reacciones no específicas (Corbel *et al.*, 1972). Esta técnica se ha aplicado en muchos países como la prueba básica de cribado (screening) en las campañas de erradicación debido a que es muy simple y sensible (Greiner *et al.*, 2009; McGiven, 2013). Además la técnica RBT está aceptada como una técnica universal para el diagnóstico de brucelosis en prácticamente todas especies animales (Garin-Bastuji & Blasco, 1997). En consecuencia, como prueba serológica, será positiva con los anticuerpos generados tras la vacunación así como por infecciones de bacterias Gram-negativas que comparten epítomos comunes con *Brucella*, causando reacciones serológicas positivas falsas, además, se requiere de muestras de suero libres de hemolisis. La prueba de fijación del complemento (CFT) permite la detección de anticuerpos (esencialmente del isotipo IgG), que son capaces de activar el complemento. Esta prueba posee una buena especificidad, por lo que es aceptada como la prueba de confirmación en las campañas de erradicación (Greiner *et al.*, 2009; Nielsen, 2012), pero tiene muchas limitaciones. En primer lugar, es menos sensible que la prueba de RBT ya que en algunas especies animales como la bovina, las IgM no son capaces de fijar el complemento. Además, es una técnica cara, de larga duración y muy compleja que requiere sueros de elevada calidad y libres de hemolisis (Nielsen, 2012). Finalmente, es una técnica afectada por los fenómenos de zona (prozona).

Las pruebas que usan extractos solubles o antígenos purificados en lugar de células íntegras son también usadas en el diagnóstico. Además de otras importantes ventajas, estos antígenos pueden ser utilizados en pruebas en las que no es posible usar antígenos celulares (como la inmunodifusión en gel de agar). De entre las pruebas serológicas que usan este tipo de antígenos solubles destacan los enzimo-inmunoensayos indirectos (iELISA) o de competición/bloqueo -cELISA- (Godfroid *et al.*, 2010; Nielsen, 2002). Es muy importante entender las equivalencias que existen entre las distintas pruebas serológicas mencionadas. Debido a su naturaleza anfipática, el LPS-S forma agregados estables en soluciones acuosas en los que, como en la membrana externa de las brucelas en fase S, el O/PS está dirigido hacia el exterior. Por lo tanto, el empleo de tales agregados solubles en pruebas como la inmunodifusión en gel hace que, independientemente del isotipo de anticuerpo que interviene (IgG, IgA o IgM), los epítomos detectados mayoritariamente (O/PS) son exactamente los mismos que los detectados en las pruebas que utilizan suspensiones de bacterias íntegras en fase S. Por el contrario, los anticuerpos frente a las secciones internas del LPS (que no son detectados en las pruebas que utilizan células íntegras) pueden ser detectados en ciertas pruebas como los ELISAs. Por ejemplo, los sueros de animales infectados por especies rugosas como *B. ovis* no dan resultado positivo en las pruebas que emplean suspensiones celulares en fase S como RBT y CFT, pero si lo hacen en pruebas que usan extractos solubles como la difusión en gel o los ELISAs (Blasco, 1990; Blasco, 2002; Nielsen, 2002). Finalmente, además de la importancia del tipo de antígeno usado, la sensibilidad de las pruebas diagnósticas dependerá en gran medida del isotipo de los anticuerpos involucrados. Por ejemplo, pese a usar el mismo antígeno (células íntegras) la sensibilidad de la prueba de RBT (que detecta todos los isotipos de inmunoglobulinas) es superior a la CFT que solo detecta IgG, al menos en bovino (Blasco, 2002). Mientras que esto no es relevante en el caso del cELISA (todos los isotipos de anticuerpos son detectados), el tipo de conjugado utilizado en los iELISA tendrá una repercusión muy importante en la sensibilidad final obtenida (Nielsen, 2002; Nielsen *et al.*, 2004).

Las pruebas diagnósticas tienen un papel crucial en la vigilancia sanitaria de las especies silvestres. De las posibles pruebas diagnósticas aplicables al diagnóstico de la brucelosis en fauna silvestre, las pruebas serológicas son las más frecuentemente usadas, por su relativa sencillez y bajo coste. El objetivo habitual de las pruebas serológicas es discriminar entre los animales expuestos y no expuestos (Godfroid *et al.*, 2010). Para ello,

es preciso validar las pruebas serológicas utilizadas usando sueros *gold standard* de animales cuyo verdadero estado infeccioso ha sido comprobado mediante la prueba inequívoca de diagnóstico que es, habitualmente, el aislamiento bacteriológico (Godfroid, 2002; Godfroid *et al.*, 2010; Godfroid *et al.*, 2013; Muñoz *et al.*, 2010). La presencia de anticuerpos frente a *Brucella* spp. sugiere una exposición a la bacteria, pero no significa necesariamente que los animales tengan una infección en el momento del muestreo. La presencia de anticuerpos puede ser el resultado de infecciones pasadas o recientes, pero también de infecciones por patógenos que causan reacciones cruzadas (Godfroid *et al.*, 2010). Pese a ello, la mayoría de pruebas serológicas utilizadas en especies de vida silvestre para el diagnóstico de la brucelosis se han trasladado directamente de aquellas utilizadas en el ganado doméstico sin ningún tipo de validación previa. Además, raramente se tiene en consideración que, incluso si una prueba serológica ha sido correctamente validada en especies domésticas, la prueba no tiene por qué interpretarse de idéntica manera en las especies silvestres, ya que la respuesta serológica del hospedador silvestre concernido puede ser muy diferente a la del hospedador doméstico y, además, hay que tener en consideración también la posible exposición de estas especies silvestres a otros patógenos susceptibles de dar reacciones cruzadas (Gardner *et al.*, 1996; Godfroid *et al.*, 2010; Godfroid *et al.*, 2013). La inmensa mayoría de estudios de brucelosis en fauna silvestre se han limitado simplemente a la determinación de la seroprevalencia mediante diversas pruebas serológicas, y han sido escasísimos los estudios en los que la infección se ha confirmado mediante estudios bacteriológicos adecuados (Cvetnić *et al.*, 2003; Grégoire *et al.*, 2012; Muñoz *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011). Además, estas pruebas de diagnóstico indirecto presentan inconvenientes muy importantes, que cuestionan seriamente muchos de los resultados obtenidos en estos estudios de determinación de seroprevalencia. Las técnicas de aglutinación (RBT en particular) son consideradas como pruebas de elección para la determinación de la seroprevalencia de brucelosis en la práctica totalidad de especies de mamíferos (Garin-bastuji & Blasco, 1997), y han sido usadas en numerosos estudios en fauna silvestre (Ebani *et al.*, 2003; Garin-Bastuji *et al.*, 2000; Gresham *et al.*, 2002; Ruiz-Fons *et al.*, 2006; Vicente *et al.*, 2002; Vengust *et al.*, 2006). Sin embargo, para que la prueba de RBT pueda aplicarse, es imprescindible usar muestras de suero de buena calidad y, especialmente, desprovistas de hemolisis, algo muy inusual en este tipo de estudios, en los que la hemolisis y contaminación de las muestras son habituales por la dificultades inherentes a su obtención, manipulación y transporte. Otra posibilidad es

usar la prueba de CFT para determinar la seroprevalencia en especies silvestres (Bergagna *et al.*, 2009; Drew *et al.*, 1992; Hubálek *et al.*, 2002; Melzer *et al.*, 2007; Wood *et al.*, 1976). Sin embargo, no existe información sobre la capacidad de las inmunoglobulinas de las diferentes especies silvestres para fijar complemento de cobayo, ni se han realizado experimentos adecuados para determinar el punto de corte (título del suero a partir del cual considerar una reacción como positiva) adecuado para cada especie silvestre objeto de estudio. Además, para la realización de la CFT es imprescindible también que las muestras de suero sean de calidad y libres de hemólisis. Todos estos factores explican que los enzimo-inmunoensayos (ELISAs) hayan sido y continúen siendo técnicas cada vez más usadas en este tipo de estudios. Su principal ventaja es que permiten analizar sueros hemolizados y de baja calidad (Neumann & Bonistalli, 2009), y que existen muchos kits comerciales en el mercado, si bien ninguno desarrollado específicamente para especies silvestres, lo que representa su principal inconveniente. En muchos estudios se han usado ELISAs disponibles comercialmente para especies domésticas, directamente y sin realizar ninguna validación previa de su eficacia diagnóstica para las especies silvestres (Al Dahouk *et al.*, 2005a; Closa-Sebastià *et al.*, 2010; Hinić *et al.*, 2009; Leuenberger *et al.*, 2007; Melzer *et al.*, 2007; Montagnaro *et al.*, 2010; Vicente *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2011), por lo que estos estudios son muy discutibles y, por tanto, de escasa significación científica.

Además de la potencial falta de sensibilidad de las técnicas utilizadas por una validación inadecuada, otro problema muy relevante es su potencial falta de especificidad. Como se ha reiterado, no hay que olvidar que existen reacciones cruzadas entre las especies lisas de *Brucella* y otras bacterias Gram-negativas, entre las que destaca principalmente *Yersinia enterocolitica* O:9 (Corbel, 1985; Kittelberger *et al.*, 1995; MacMillan, 1990; Moriyón & López-Goñi, 2002), cuya prevalencia real en las especies silvestres es prácticamente desconocida, y que podrían dar lugar a importantes errores diagnósticos (Al Dahouk *et al.*, 2005a; Jungersen *et al.*, 2006). De hecho, tanto el cerdo como el jabalí pueden infectarse por *Y. enterocolitica* O:9 (Fredriksson-Ahomaa *et al.*, 2009; McNally *et al.*, 2004).

En definitiva, la validación adecuada de las técnicas utilizadas para la determinación de la seroprevalencia de brucelosis en la fauna silvestre debería ser absolutamente imprescindible para que los resultados obtenidos tengan suficiente significación (Godfroid *et al.*, 2010; Hueffer *et al.*, 2013). La ausencia de sueros *gold standard* de las

diferentes especies silvestres es un problema clave que impide la adecuada validación de estas técnicas (particularmente las cuantitativas). Sin embargo, existen potenciales estrategias para resolver este problema, como podría ser el uso de sueros *gold standard* obtenidos de las especies domésticas más relacionadas filogenéticamente con la especie silvestre objeto de estudio (Muñoz *et al.*, 2010; Muñoz *et al.*, 2012).

Otro problema importante de las pruebas ELISA, es que precisan de reactivos específicos (conjugados anti-especie) que normalmente no están disponibles comercialmente. Esta limitación también puede paliarse, en cierta medida, mediante el uso de conjugados a base de proteína A o proteína G (o ambas simultáneamente), que por su capacidad de unirse a inmunoglobulinas de muchas especies animales, pueden usarse como alternativa a los conjugados específicos (Muñoz *et al.*, 2010; Nielsen *et al.*, 2004; Tryland *et al.*, 1999; Tryland *et al.*, 2001). Además, también pueden utilizarse otras técnicas como los ELISA de bloqueo o competición (cELISA) o la prueba de polarización de la fluorescencia (FPA), que no necesitan conjugados específicos de especie, y podrían ser útiles en la detección de anticuerpos frente a *Brucella* spp. en diversas especies silvestres (Gall *et al.*, 2000; Gall *et al.*, 2001; Nielsen & Gall, 2001; Schumaker *et al.*, 2010; Van Houten *et al.*, 2003). El problema de esta última técnica es la inexistencia de valores de referencia (puntos de corte) para las especies silvestres, la ausencia de validación en las mismas, la necesidad de un equipamiento caro y sofisticado, su elevado coste, y, además, la dependencia de un único test comercial en manos de una única compañía.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- ÁREA Y PERIODO DE ESTUDIO

El área de estudio ha comprendido la Comunidad Autónoma de Aragón, situada al nordeste de la península ibérica. Políticamente está formada por tres provincias: Huesca, Teruel y Zaragoza. Aparte de las provincias, Aragón cuenta con una división comarcal prevista en el *artículo 5* del estatuto de autonomía de Aragón.



Figura 1: Mapa comarcal de la Comunidad Autónoma de Aragón.

Las 33 comarcas de Aragón son: Alto Gállego, Andorra-Sierra de Arcos, Aranda, Bajo Aragón, Bajo Aragón-Caspe, Bajo Cinca, Bajo Martín, Campo de Belchite, Campo de Borja, Campo de Cariñena, Campo de Daroca, Cinca Medio, Cinco Villas, Comunidad de Calatayud, Comunidad de Teruel, Cuencas Mineras, D.C. Zaragoza, Gúdar-Javalambre, Hoya de Huesca, Jiloca, La Jacetania, La Litera, La Ribagorza, Los Monegros, Maestrazgo, Matarraña, Ribera Alta del Ebro, Ribera Baja del Ebro, Sierra de Albarracín, Sobrarbe, Somontano de Barbastro, Tarazona y el Moncayo, y Valdejalón.

El trabajo se ha llevado a cabo en reservas de caza, cotos sociales de caza y cotos deportivos de caza de la Comunidad Autónoma en los que se efectúa un aprovechamiento cinegético del jabalí y la liebre. Las reservas de caza y los cotos sociales de caza son gestionados por la administración de la Comunidad Autónoma de Aragón, sin embargo en los cotos deportivos de caza, la gestión del aprovechamiento cinegético se promueve por las sociedades deportivas de cazadores.

Las reservas de caza (rr.cc.) se encuentran distribuidas en la provincia de Huesca y Teruel. En Huesca contamos con las rr.cc. de Los Valles, La Garcipollera, Viñamala, Los Circos y Benasque (situadas en el Pirineo aragonés), mientras que en la provincia de Teruel se sitúan las rr.cc. de Puertos de Tortosa y Beceite, Masías de Ejulve y Montes Universales. Los cotos sociales (cc.ss.) de caza situados en la provincia de Huesca son: Artaso y Sieso, Caldearenas, Isín y Asún, Nueveciercos, La Pardina de Fanlo y La Solana de Burgasé. En la provincia de Zaragoza se sitúan los cc.ss. de Alcañicejos-Las Hoyas (Tosos), Azuara y Rueita y Los Landes. Los cotos deportivos de caza fueron elegidos en función de su situación geográfica dentro de las diferentes comarcas, de tal manera que fuese posible conseguir un número mínimo de muestras por comarca y especie, representativas de todas las comarcas de Aragón. Además, una característica importante tomada en cuenta a la hora de seleccionar los puntos de muestreo fue el número de piezas abatidas por temporada y la facilidad de acceso por carretera, intentando así maximizar el rendimiento de los desplazamientos realizados. Durante el periodo de estudio se obtuvieron muestras de todas las reservas de caza y cotos sociales de caza anteriormente citadas. Con la excepción de la Ribera Alta del Ebro, todas las comarcas de Aragón fueron muestreadas.

El periodo de recogida de muestras comprendió desde el 1 de septiembre del 2008 hasta el 31 de agosto del 2012. El jabalí y las diferentes especies de liebre presentes en

Aragón están catalogadas como especies cinegéticas y su caza está regulada por la *Ley de Caza de Aragón* (Ley 5/2002 de 4 de abril) y por las órdenes generales de veda anuales que dicta el Departamento de Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente y que conforman el plan general de caza. En el caso del jabalí, como especie de caza mayor, su periodo hábil de caza comprende desde octubre a febrero, con pequeñas variaciones anuales. Normalmente suele empezar el primer domingo de octubre o el tercero de septiembre y finalizar el último domingo de febrero. La liebre es considerada especie de caza menor, y su periodo hábil comienza el segundo domingo de octubre y finaliza el tercer domingo de enero. Los días para la caza dentro de los periodos hábiles son fijados y definidos en el plan anual de aprovechamiento cinegético de cada coto de caza, siendo estos días normalmente los jueves, sábados, domingos y días festivos.

En el mencionado periodo de estudio, se incluyeron 4 temporadas de caza completas que a los efectos de esta tesis denominaremos: *Primera temporada* (2008-09), *Segunda temporada* (2009-10), *Tercera temporada* (2010-11) y *Cuarta temporada* (2011-12). La toma y recogida de muestras de jabalíes y liebres abatidas tuvo lugar dentro de las temporadas de caza comentadas, aunque ocasionalmente, algunos animales o muestras llegaron también a la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza (FVUZ) fuera de la temporada de caza.

Los perros de caza fueron muestreados de marzo a septiembre de cada temporada, fuera del periodo cinegético, evitando así molestias a animales y propietarios.

3.2.- ESTUDIO DE LA BRUCELOSIS EN EL JABALÍ

3.2.1.- OBTENCIÓN Y ORIGEN GEOGRÁFICO DE LAS MUESTRAS

La realización de este trabajo se ha llevado a cabo gracias al proyecto INIA FAU2008-00015-C02-00 y a la colaboración entre la Universidad de Zaragoza y el Departamento de Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente del Gobierno de Aragón para la realización del seguimiento sanitario de la fauna cinegética en la Comunidad Autónoma. Este seguimiento se puso en marcha en el año 1999, aumentando progresivamente las especies estudiadas desde entonces, así como el número de muestras analizadas. El objetivo esencial de dicho convenio es conocer los procesos patológicos que afectan a las poblaciones silvestres, así como detectar tempranamente la

presencia en las mismas de diferentes zoonosis que puedan suponer un riesgo para la salud pública. El seguimiento sanitario se basa en el estudio de los animales encontrados muertos, enfermos o cazados. Para la ejecución del mencionado estudio se cuenta con una red de congeladores (-20°C) y centrifugas distribuidas por diferentes puntos de la geografía aragonesa, lo que permite el almacenamiento de animales y muestras biológicas, además de la obtención y conservación de sueros. Las muestras así conservadas van remitiéndose periódicamente al Departamento de Patología Animal de la FVUZ para la realización de análisis. El personal implicado en la ejecución de este trabajo de toma de muestras ha sido esencialmente el colectivo de Agentes de Protección de la Naturaleza (APNs) del Gobierno de Aragón. Sin embargo, en los cotos deportivos de caza contamos en todos los casos con la autorización y colaboración de los titulares de los cotos para la toma de muestras, así como la participación activa de muchos cazadores durante la toma de muestras. Se mantuvo un estrecho contacto con los titulares de los cotos deportivos de caza y los propios cazadores, para determinar los lugares y horarios precisos de las batidas, y siempre que nos fue posible, tratamos de acompañar personalmente al cazador para mostrarle el procedimiento más adecuado para la toma de muestras. Las batidas de jabalí se realizaban habitualmente en sábado, domingo, y días festivos. En este caso, se acudió siempre al finalizar la batida al lugar convenido para la toma de muestras.

Los APNs, guardas de caza y celadores comarcales fueron igualmente formados en la toma de muestras de jabalíes abatidos tanto en reservas de caza como en cotos sociales. Se les proporcionaron bolsas y tubos de plástico. Las muestras fueron identificadas con el tamaño (como indicador indirecto de la edad: *Grande*, *Mediano* y *Pequeño*) y sexo del animal abatido, así como con datos de la localidad y fecha, y fueron almacenadas en congeladores hasta su remisión a la FVUZ para su posterior análisis. Algunos cazadores también fueron formados en la toma de muestras, proporcionándoles también material para su recogida.

Las muestras se clasificaron también según su origen geográfico (comarca), especie animal, con indicación de si se trataba de un animal cazado o encontrado muerto y, finalmente, por temporada de caza. Sistemáticamente se otorgó una referencia a todos los animales o muestras que llegaban a la FVUZ o eran tomadas por nosotros. De este modo se generaba una ficha dentro de la base de datos, y la referencia dada a cada

muestra estaba constituida por el número correlativo al orden de entrada, seguido del año.

Para un mejor conocimiento de la distribución de la brucelosis en jabalíes en Aragón, las muestras fueron clasificadas en función de la comarca de procedencia. Se consideró oportuno priorizar el muestreo en zonas que nunca antes habían sido muestreadas, así como intentar obtener el mayor número de muestras posibles por cada comarca. Además, en cada comarca se intentó obtener las muestras de diferentes cotos de caza distantes entre sí, para obtener una muestra representativa. Sin embargo, esto no fue posible en ocasiones por diversas razones, como el escaso número de piezas abatidas, la mala fortuna al asistir a batidas de jabalí sin que se lograra ninguna pieza, etc.



Figura 2: Imágenes de la toma de muestras de jabalí en campo.

El tamaño mínimo de muestra por comarca se determinó según la fórmula clásicamente propuesta para este tipo de estudios (Cannon & Roe, 1982), y utilizando un nivel de confianza del 99%. Ante la ausencia de datos sobre la población de jabalí de cada comarca, se utilizó como referencia el número de jabalíes abatidos por comarca, usando los datos oficiales del INAGA (Instituto Aragonés de Gestión Ambiental). Teniendo en consideración este dato de animales abatidos y utilizando datos de

prevalencia de brucelosis en el jabalí en la Comunidad Autónoma de Aragón publicados previamente (Martínez *et al.*, 2010; Muñoz *et al.*, 2010), se calculó el número de animales necesarios para detectar la infección con suficiente precisión estadística. De esta manera, se determinó que sería necesario tomar un mínimo de 20 muestras de jabalí por cada comarca. Exceptuando la Ribera Alta del Ebro, se obtuvieron muestras de jabalíes de todas las comarcas de Aragón, si bien en 9 de ellas (tabla 1) no se pudo llegar a obtener el número mínimo de muestras mencionado.

Para determinar la situación de la brucelosis en el jabalí fueron obtenidas un total de 1.949 muestras. De este número total de muestras, 1.936 correspondían a animales cazados y tan solo 13 muestras correspondieron a animales encontrados muertos. El número de jabalíes muestreados en cada temporada de caza se presenta en la figura 3.

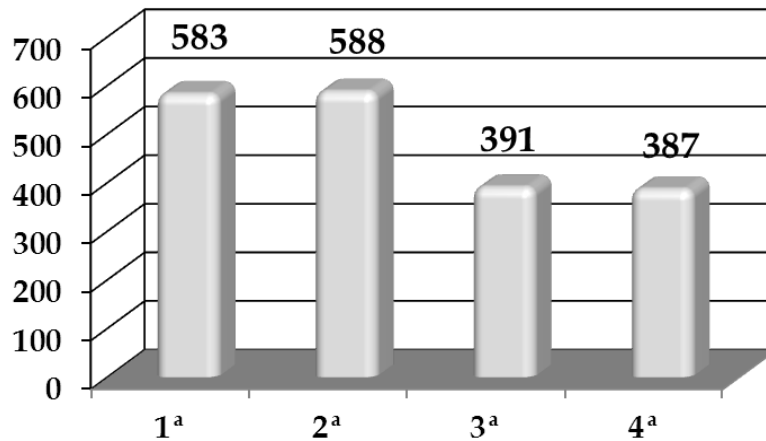


Figura 3: Número de jabalíes muestreados por temporada de caza.

En los jabalíes abatidos se determinó el sexo y se estimó su edad aproximada en función de su tamaño. Cada animal fue identificado como: *Grande*, *Mediano* o *Pequeño*, y esto se correspondió con animales adultos, juveniles y jabatos. Esta sencilla clasificación se utilizó para evitar confusiones y malas interpretaciones, cuenta tenida de la gran cantidad y variedad de personas que participaron en la toma de muestras. Los jabalíes abatidos en campo y muestreados por nosotros fueron, además, inspeccionados externamente y fotografiados.

Del total de las 1.949 muestras de jabalí obtenidas, 1.569 correspondían a muestras con suero, mientras que el resto (380) contenían exclusivamente tejido. El número de muestras por comarca se presentan en la tabla 1.

Comarcas	Nº de jabalíes muestreados	Nº de sueros obtenidos	Nº jabalíes con suero y muestras para cultivo
Alto Gállego	186	140	118
Andorra-Sierra de Arcos	13	13	13
Aranda	19	19	19
Bajo Aragón	39	32	32
Bajo Aragón-Caspe	23	19	19
Bajo Cinca	33	32	32
Bajo Martín	18	18	18
Campo de Belchite	48	45	45
Campo de Borja	29	25	25
Campo de Cariñena	55	29	29
Campo de Daroca	22	20	20
Cinca Medio	22	22	22
Cinco Villas	209	141	138
Comunidad de Calatayud	22	21	21
Comunidad de Teruel	15	15	15
Cuencas Mineras	12	12	12
D.C. Zaragoza	42	38	38
Gúdar-Javalambre	55	47	47
Hoya de Huesca	33	33	33
Jiloca	7	7	7
La Jacetania	257	205	174
La Litera	15	15	15
La Ribagorza	237	175	167
Los Monegros	42	41	41
Maestrazgo	23	20	17
Matarraña	26	24	24
Ribera Baja del Ebro	25	24	24
Sierra de Albarracín	29	28	25
Sobrarbe	320	236	195
Somontano de Barbastro	15	15	14
Tarazona y el Moncayo	57	57	53
Valdejalón	1	1	1
Total	1.949	1.569	1.453

Tabla 1: Número de jabalíes muestreados y muestras tomadas en las diferentes comarcas.

En consecuencia, de los 1.949 jabalíes muestreados tan solo se pudo obtener suero en un total de 1.569 casos. Puesto que en 116 animales solo se dispuso muestra de suero pero no de tejido, y en 380 animales solo se dispuso de muestras de tejido pero no de suero, tan solo un total de 1.453 animales poseían suero y tejidos para cultivo bacteriológico. El tamaño (edad) de los jabalíes de los que se dispuso de una muestra de suero solo pudo estimarse en 982 animales: 635 adultos, 294 juveniles y 53 jabatos. De igual manera, el sexo de los jabalíes de los que se obtuvo una muestra de suero solo pudo determinarse en 1.190 animales (594 machos y 596 hembras).

La extracción de sangre se realizó directamente de la cavidad torácica o, cuando fue posible, aprovechando la hemorragia del disparo para obtener suero de mejor calidad. La sangre fue recogida en tubos de plástico de 10 ml, dejándola coagular. Todas las muestras de sangre se centrifugaron posteriormente durante 10 minutos a 800-1.000g y el suero resultante fue almacenado en viales de plástico y conservado a -20°C. Como

consecuencia lógica del proceso de obtención, la mayoría de sueros presentaron un importante grado de hemolisis, que los hacía inadecuados para la aplicación de la técnica diagnóstica de aglutinación con antígeno rosa de Bengala (RBT). La distribución de sueros de jabalí obtenidos en las diferentes temporadas de cada se presenta en la figura 4.

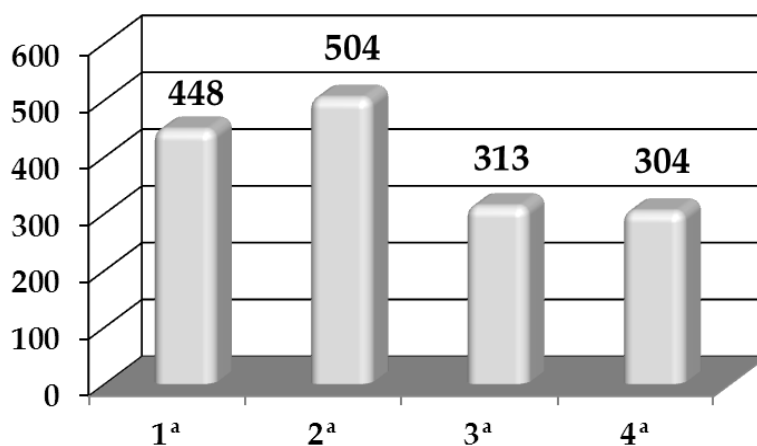


Figura 4: Número de sueros de jabalí obtenidos por temporada de caza.

En todos los casos, la toma de muestras para bacteriología se realizó lo antes posible tras la muerte del animal, utilizando instrumentos y material estéril adecuado para evitar posibles contaminaciones de las muestras. Las muestras que se tomaron fueron: linfonodos mandibulares, linfonodos escrotales, linfonodos mamarios, bazo, hígado y pulmón, así como testículos, epidídimos, glándulas bulbo-uretrales y vesículas seminales en los machos y una muestra del útero en las hembras. En ocasiones, también se tomaron muestras de articulaciones que presentaban alguna alteración. No siempre fue posible obtener todas las muestras, dependiendo esencialmente del estado final del animal encontrado muerto por los APNs, y en el caso de los animales cazados, de la localización del disparo, la existencia de depredación por parte de perros de caza, el grado de evisceración en el que encontramos las canales y también de la autorización del cazador para realizar la apertura de la cavidad abdominal y la extracción de muestras. Los tejidos fueron colocados en bolsas de plástico que eran etiquetadas individualmente y transportados refrigerados en el menor tiempo posible a la FVUZ. En 1.409 animales se dispuso de muestras de al menos un linfonodo (mandibulares, mamarios o escrotales), en 493 se dispuso al menos de bazo y en 182 se dispuso además de muestras del aparato reproductor.

3.2.2.- METODOLOGÍA DE ESTUDIO

Para determinar la situación de la brucelosis en el jabalí, las muestras tomadas fueron estudiadas mediante técnicas serológicas, bacteriológicas e histopatológicas.

3.2.2.1.- Estudio serológico

Un total de 1.569 sueros de jabalí (tabla 1) fueron analizados para determinar la presencia de anticuerpos frente a *Brucella*. Debido a la imposibilidad de aplicar la técnica de aglutinación RBT, por el importante grado de hemolisis de las muestras, la técnica utilizada para dicho estudio fue un ELISA indirecto (iELISA), desarrollado recientemente para la detección de anticuerpos inducidos por especies lisas de *Brucella* en ungulados silvestres (Muñoz *et al.*, 2010). Brevemente, un extracto antigénico enriquecido en lipopolisacárido liso (LPS-S) de *B. melitensis* 16M (Leong *et al.*, 1970) fue adsorbido en placas de poliestireno, (Nunc Maxisorp. Dinamarca). Las concentraciones óptimas de LPS-S y de cada reactivo fueron calculadas utilizando como *gold standard* una colección de sueros de ganado porcino, como especie más relacionada desde el punto de vista filogenético con el jabalí, y de la cual se disponía en el laboratorio del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón. Gobierno de Aragón (CITA). La dilución óptima de cada suero se analizaron por duplicado y la reacción fue revelada usando concentraciones adecuadas de proteína G/peroxidasa como conjugado y 2,2'-Azinodi-[3-etilbenzotiazolín sulfonato] (ABTS) como cromógeno. Los resultados se expresaron como porcentaje de la densidad óptica (DO), aplicando la siguiente fórmula:

$$\%DO = \text{media de las } DO_{\text{muestra}} \times 100 / \text{media de } DO_{\text{suero control positivo}}$$

Debido a la ausencia de sueros *gold standard* (jabalíes infectados y libres de infección), para la puesta a punto (determinación de las concentraciones óptimas de los distintos reactivos) y validación (determinación del punto de corte y de la sensibilidad y especificidad diagnósticas) de dicho iELISA, se utilizó una colección de sueros de 54 cerdos domésticos infectados de manera natural por *B. suis* biovar 2 y de 80 cerdos libres de brucelosis (proporcionada por el laboratorio de brucelosis del CITA. Gobierno de Aragón), siguiendo la metodología descrita previamente (Muñoz *et al.*, 2012). De acuerdo con la validación realizada, obtuvimos un 100% de sensibilidad y especificidad diagnósticas con dichos sueros porcinos. Todos los sueros de jabalí fueron analizados en

las mismas condiciones que los sueros porcinos y aquellos que presentaron una media de DO superior a la establecida como punto de corte en porcino (40% de la DO del suero control positivo) fueron considerados como positivos.

3.2.2.2.- Estudio bacteriológico y molecular de las cepas aisladas

Todas las muestras de tejido tomadas de animales que resultaron positivos en la técnica de iELISA mencionada, fueron sometidas a estudio bacteriológico. Además de estas muestras, e independientemente de su resultado serológico, todas aquellas muestras de tejidos que presentaron lesiones compatibles con la infección durante la inspección macroscópica, fueron sometidas también a estudio bacteriológico. Finalmente, para comprobar la especificidad de la estrategia propuesta, un número de muestras representativo (n=50) de la población de animales seronegativos en el iELISA, fue sometido también a estudio bacteriológico. Las muestras de tejido de animales de los que no se dispuso de suero permanecieron archivadas y congeladas en FVUZ para posteriores estudios.

Las muestras se procesaron asépticamente y utilizando siempre instrumentos estériles para tratar de evitar la contaminación externa o cruzada de las muestras. Tras retirar la grasa y restos de tejido conectivo, las muestras se descontaminaron superficialmente mediante inmersión en etanol y flameado breve de la superficie de las mismas. Posteriormente las muestras fueron introducidas en bolsas estériles donde se maceraron con un "Stomacher", añadiendo previamente una pequeña cantidad de solución salina estéril tamponada (PBS 10 mM, pH 7,2; 0,85% ClNa), antes de inocularlas en medios sólidos. Aproximadamente 0,5 ml de cada homogenizado se inoculó en cada placa de medio de cultivo, extendiéndolo por toda la superficie de la placa con un hisopo estéril. Todas las muestras se inocularon siempre por duplicado, utilizando al menos una placa de medio de Farrell (Farrell, 1974) y otra de medio CITA (de Miguel *et al.*, 2011). Todas las placas inoculadas se incubaron durante 5-7 días a 37°C en una atmósfera con alrededor de un 90% de humedad y conteniendo un 5-10% de CO₂.

Las colonias aisladas fueron identificadas presuntivamente como *Brucella* spp. mediante observación directa de la morfología colonial característica, y las pruebas de oxidasa y ureasa (Alton *et al.*, 1988). La identificación definitiva y diferenciación de las

especies de *Brucella*, se realizó mediante “Bruce-ladder” siguiendo el procedimiento descrito anteriormente (García-Yoldi *et al.*, 2006; López-Goñi *et al.*, 2008). Para ello, la extracción de ADN se realizó directamente a partir de las colonias aisladas mediante un kit comercial (QIAamp DNA minikit; QIAGEN®, Hamgurg, Germany). El ADN obtenido se resuspendió en agua destilada libre de ADNasa y ARNasa y se guardó a -20°C hasta el momento de realizar los estudios moleculares. La identificación de la biovariedad se completó utilizando las pruebas de tipificación microbiológica convencional (Alton *et al.*, 1988; Nielsen, 2012). Además, todas las cepas identificadas como *B. suis* fueron caracterizadas también a nivel de biovar por análisis de las muestras de ADN mediante un PCR multiplex “Suis-ladder”, diseñado específicamente para tal fin (López-Goñi *et al.*, 2011). Finalmente, una vez confirmada cada cepa como *B. suis* biovar 2, sus correspondientes muestras de ADN fueron estudiadas también mediante PCR-RFLP de los genes *Omp31*, *Omp2a* y *Omp2b* (Cloeckert *et al.*, 1995; Vizcaíno *et al.*, 1997) para determinar su particular haplotipo, tal y como se ha descrito previamente (Muñoz *et al.*, 2010). Como cepas control de referencia para todos estos estudios se utilizaron las siguientes: *B. abortus* biovar 1 (cepa de referencia 2308); *B. melitensis* biovar 1 (cepa de referencia 16M); *B. ovis* (cepa de referencia PA); *B. suis* biovar 1 (cepa de referencia 1330); *B. suis* biovar 2 (cepa de referencia Thomsem); *B. suis* biovar 3 (cepa de referencia 686); *B. canis* cepa (cepa de referencia 66/6); *B. abortus* biovar 1 cepa S19 (vacuna); *B. abortus* biovar 1 cepa RB51 (vacuna); *B. melitensis* biovar 1 cepa Rev.1 (vacuna); *B. neotomae* (cepa de referencia SK33); *B. pinipedialis* (cepa de referencia B2/94); *B. ceti* (cepa de referencia B1/94); *B. microti* (cepa de referencia 4915); *B. inopinata* (cepa de referencia BO-01).

3.2.2.3.- Estudio anatomopatológico

Durante la toma de muestras en campo y en las necropsias, se incidió en la búsqueda de lesiones macroscópicas compatibles con brucelosis (Enright, 1990; Olsen *et al.*, 2012). Solo se inspeccionaron los órganos de jabalíes abatidos en campo y en nuestra presencia, y las muestras fueron tomadas directamente por nosotros. Un total de 366 bazos, 126 testículos y epidídimos y 21 úteros de otros tantos animales fueron inspeccionados macroscópicamente. Tras dicho reconocimiento, se procedía al archivo y congelación de dichas muestras a -20°C. Aquellas muestras que presentaron lesiones compatibles o sospechosas de brucelosis, e independientemente del resultado serológico

obtenido, fueron sometidas inmediatamente a estudio bacteriológico como se ha indicado antes.

Los jabalíes encontrados muertos (un total de 13) y recogidos del medio natural por los Agentes de Protección de la Naturaleza (APNs) fueron congelados y posteriormente trasladados a la FVUZ, donde se procedió a su descongelación controlada realizándose la necropsia, recogiendo todos los órganos indicados anteriormente. Todas las necropsias se completaron con la toma de datos biométricos, la inspección macroscópica y el estudio histológico de aquellas lesiones compatibles con brucelosis.

Las muestras sospechosas de presentar lesiones compatibles con brucelosis se fijaron en formol tamponado al 10% lo antes posible, evitando así procesos de autólisis. Las muestras se mantuvieron en formol el tiempo necesario hasta su completa fijación y los tejidos fijados fueron tallados en secciones de 3-4 mm de espesor y colocados en casetes de plásticos en formol tamponado al 10%. Una vez acabada la etapa de fijación de las muestras, estas eran lavadas con agua corriente durante media hora antes de su inclusión en parafina. Una vez fijadas y lavadas, se deshidrataban utilizando un procesador histológico automático con alcoholes en concentraciones crecientes. La inclusión en parafina se facilitó con una mezcla al 50% de xilol en un primer baño y en un segundo baño solo con parafina, ambos a 56°C. Posteriormente la elaboración de los bloques se realizó de manera semiautomática mediante la unidad formadora de bloques. Estos bloques fueron cortados con un microtomo con cuchillas desechables. Los cortes obtenidos tenían un grosor de entre 4-5 μm y eran depositados en la superficie de un baño maría a 37°C para favorecer su estiramiento. Los cortes eran recogidos de la superficie con portaobjetos ayudándonos de un pincel o aguja histológica y los portaobjetos fueron tratados previamente para favorecer la adherencia de la muestra. Para la tinción de rutina hematoxilina-eosina -H-E- (Bancroft & Gamble, 2008), los portaobjetos fueron tratados con albúmina glicerizada de Mayer. Los cortes procedentes de bloques para inmunohistoquímica (IHQ) fueron depositados en portaobjetos gelatinizados para favorecer la adhesión del corte, especialmente durante el proceso de tinción y lavado de la muestra. Dichos cortes permanecían 12-24 h en estufa a 37°C para su secado. Una vez desparafinados, se hidrataban y se teñían de manera rutinaria con la tinción de H-E.

En aquellos órganos que presentaron lesiones macro y microscópicas compatibles con brucelosis se realizó una tinción de inmunohistoquímica para detección de antígenos de *Brucella* en los tejidos. Para ello las muestras fueron desparafinadas en xilol e hidratadas mediante paso sucesivo por series decrecientes de etanol y posteriormente fueron incubadas 20 minutos en una solución al 0,3% de H₂O₂ en TBS-metanol para bloquear la peroxidasa endógena. La recuperación o desenmascaramiento de antígenos se realizó en olla a presión con agua destilada a pH 4 (Norton *et al.*, 1994). Una vez preparadas y enfriadas, las muestras fueron incubadas 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo policlonal de conejo frente a *B. melitensis* 16M, suministrado por el Dr. J.M. Blasco (CITA. Gobierno de Aragón) y la reacción detectada mediante un anticuerpo secundario anti-conejo unido a un polímero marcado con peroxidasa-HRP (Sistema EnVision™, Dako, CA, EE.UU.). Como revelador de la reacción se utilizó diaminobencidina (Liquid DAB, Dako, CA, EE.UU.) y para contrastar la reacción los cortes fueron teñidos brevemente con hematoxilina de Mayer. Una vez finalizada la tinción los portaobjetos fueron deshidratados en series crecientes de etanol, aclarados en xilol y montados con DPX. Como controles de la reacción se sometieron al mismo procesamiento muestras de tejido de una cerda infectada por *B. suis* (control positivo) y muestras de tejidos similares procedentes de cerdos libres de infección (control negativo)

3.3.- ESTUDIO DE BRUCELOSIS EN LA LIEBRE

3.3.1.- OBTENCIÓN Y ORIGEN GEOGRÁFICO DE LAS MUESTRAS

Al igual que en el caso del jabalí, la obtención de muestras de liebre se ha llevado a cabo gracias al proyecto INIA FAU2008-00015-C02-00 y a la colaboración entre la Universidad de Zaragoza y el Departamento de Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente del Gobierno de Aragón. Durante la temporada de caza menor, los cazadores fueron instruidos en la recogida de vísceras y sangre de liebre. Se les proporcionaron bolsas y tubos de plástico. Los cazadores evisceraban las liebres abatidas, y extraían los órganos de la cavidad abdominal (bazo, hígado, aparato digestivo y reproductor) y cavidad torácica (corazón y pulmón), que eran introducidos en la bolsa de plástico. La sangre, siempre que fue posible, fue recogida de la cavidad torácica durante la evisceración. Todas las bolsas con muestras fueron etiquetadas con la edad, sexo, fecha y lugar y nos fueron remitidas directamente o bien congeladas a la FVUZ.

Cuando era posible acudíamos a un punto de encuentro con los cazadores y personalmente extraíamos las vísceras y tomábamos las muestras de sangre. La sangre era recogida en tubos de plástico de 10 ml, en los que se dejaba coagular para después centrifugar durante 10 minutos a 800-1.000g y así obtener el suero que almacenábamos en viales de plástico congelados a -20°C. Dependiendo del tiempo transcurrido tras la muerte de las liebres y de las condiciones climatológicas, gran parte de los sueros presentaban un elevado grado de hemólisis, que los hacía inadecuados para la aplicación de la técnica diagnóstica de aglutinación rápida (RBT).

Dependiendo del tiempo transcurrido tras la muerte de las liebres y de las condiciones climatológicas, gran parte de los sueros presentaban un elevado grado de hemólisis, que los hacía inadecuados para la aplicación de la técnica diagnóstica de aglutinación rápida (RBT).

Las muestras se clasificaron según su origen geográfico (comarca), especie animal, animal cazado o muerto y, finalmente, por temporada de caza. Sistemáticamente se otorgó una referencia a los animales o muestras que eran tomadas por nosotros o llegaban a la FVUZ. Un total de 282 muestras de liebres tanto ibéricas (*Lepus granatensis*; n= 247) como europeas (*Lepus europaeus*; n= 35), fueron utilizadas durante la realización de esta tesis.



Figura 5: Imágenes de la toma de muestras de liebre en campo.

Ante el desconocimiento de la situación de la brucelosis en la liebre en Aragón, se consideró oportuno intentar obtener un elevado número de muestras sin importar demasiado su procedencia geográfica.

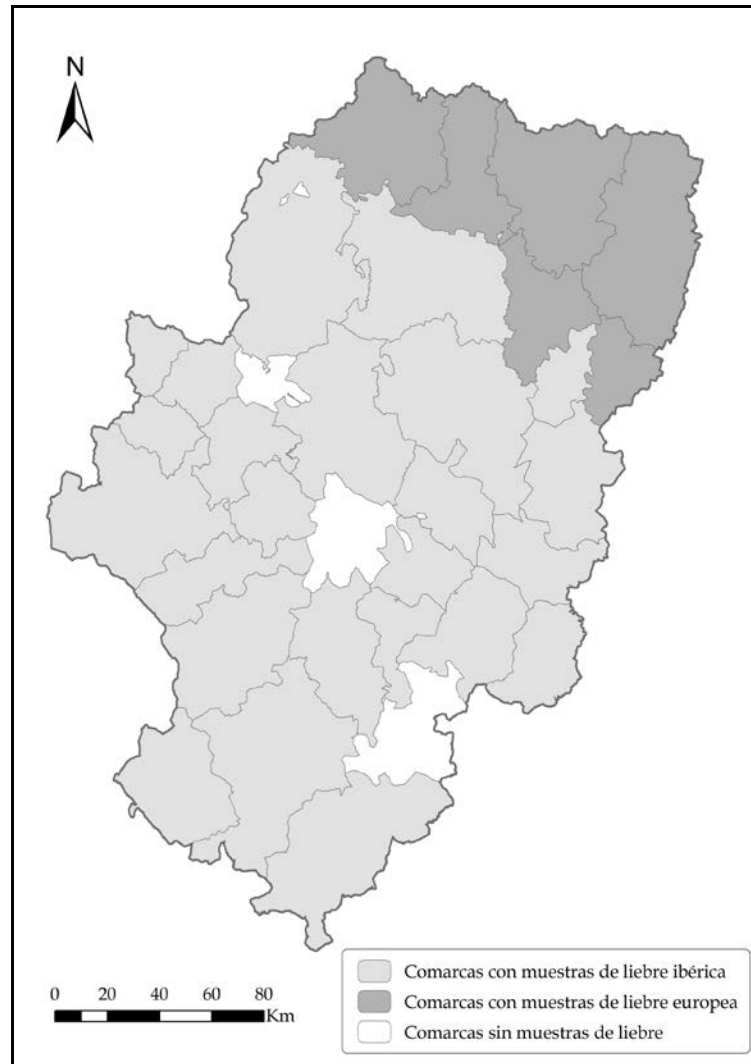


Figura 6: Distribución comarcal de muestras de liebre en Aragón.

Las muestras de liebre europea correspondían a las comarcas pirenaicas y prepirenaicas (rango de distribución en Aragón) como Alto Gállego, La Jacetania, La Litera, La Ribagorza, Sobrarbe, Somontano de Barbastro y Navarra, mientras que las muestras de liebre ibérica provinieron del resto de comarcas (figura 6; tabla 2), exceptuando Campo de Belchite, Maestrazgo y Ribera Alta del Ebro, en las que no fue posible obtener muestras (figura 6).

Comarca	Nº de liebres	Nº de sueros
Alto Gállego	6	6
Andorra-Sierra de Arcos	1	1
Aranda	1	0
Bajo Aragón	14	14
Bajo Aragón-Caspe	19	18
Bajo Cinca	2	2
Bajo Martín	30	30
Campo de Borja	10	9
Campo de Cariñena	14	12
Campo de Daroca	1	1
Cinca Medio	2	2
Cinco Villas	2	2
Comunidad de Calatayud	8	7
Comunidad de Teruel	3	3
Cuencas Mineras	3	3
D.C. Zaragoza	31	28
Gúdar-Javalambre	7	7
Hoya de Huesca	1	1
Jiloca	6	4
La Jacetania	11	10
La Litera	1	1
La Ribagorza	9	9
Los Monegros	5	4
Matarraña	2	2
Ribera Baja del Ebro	22	21
Sierra de Albarracín	11	10
Sobrarbe	2	2
Somontano de Barbastro	1	1
Tarazona y el Moncayo	7	1
Valdejalón	3	3
Otras regiones	47	47
Total	282	261

Tabla 2: Número de muestras de liebres por comarcas.

Además, para aumentar el número de muestras y tener una mejor idea de la importancia del problema en España y Aragón, en nuestro estudio incluimos también muestras de 45 liebres de Aragón (incluidas en los datos de la tabla 2) y 47 de otras Comunidades Autónomas, tomadas con anterioridad al periodo de estudio y conservadas en congelación en la FVUZ (tabla 3).

De todas estas muestras, 169 correspondían a ejemplares cazados y 113 a ejemplares encontrados muertos.

En las liebres cazadas se determinó el sexo y se estimó la edad en función del tamaño de la pieza cazada. Este sencillo método se utilizó también para evitar confusiones cuenta tenida la gran variedad de personas que colaboraron en la toma de muestras. En consecuencia, cada animal fue identificado como *adulto* (ejemplares de tamaño medio o grande) o *juvenil* (ejemplares de tamaño pequeño). Además, las liebres cazadas en campo y muestreadas por nosotros fueron inspeccionadas externamente y fotografiadas.

Provincia	Nº de liebres
Albacete	1
Burgos	3
Ciudad Real	5
La Rioja	4
Navarra	5
Palencia	1
Salamanca	2
Segovia	3
Sevilla	3
Soria	5
Toledo	1
Valladolid	6
Zamora	8
Total	47

Tabla 3: Número y procedencia de muestras de liebres de otras regiones.

Del total de muestras de liebre, 190 fueron obtenidas durante el periodo de estudio en Aragón, 169 correspondían a ejemplares cazados y 21 a animales encontrados muertos. El sexo de las liebres pudo ser determinado en 172 animales (79 machos y 93 hembras). La edad fue estimada en 153 animales: 121 *adultos* y 32 *juveniles*. De las 282 muestras de liebre obtenidas, 261 correspondían a muestras con suero y el resto (21) contenían exclusivamente tejido. De los 261 sueros de liebre, 34 correspondían a liebre europea y 227 a liebre ibérica. Puesto que en 15 animales solo se dispuso de muestra de suero pero no de tejido, y en 21 animales solo se dispusieron de muestras de tejido pero no de suero, un total de 246 animales poseían muestras de suero y tejidos para cultivo bacteriológico. Los animales encontrados muertos durante el periodo de estudio en Aragón fueron 21 (*Lepus granatensis*, n= 8; *Lepus europaeus*, n= 13). Las liebres recogidas del medio natural por los APNs fueron congeladas y posteriormente fueron trasladadas a la FVUZ, donde se procedía a su descongelación controlada y se realizaba la necropsia y toma de muestras. También se contó con tejido de 8 liebres europeas que fueron necropsiadas con anterioridad al periodo de estudio y permanecieron archivadas y congeladas a -20°C.

Las muestras de liebre más utilizadas en el estudio bacteriológico fueron de tejido linfoide (bazo y linfonodos). Además también fueron cultivados el hígado y los órganos reproductores tanto de machos como de hembras.

3.3.2.- METODOLOGÍA DE ESTUDIO

Para determinar la situación de la brucelosis en la liebre, las muestras tomadas fueron estudiadas mediante técnicas serológicas, bacteriológicas e histopatológicas.

3.3.2.1.- Estudio serológico

Un total de 261 sueros de liebre fueron analizados para determinar la presencia de anticuerpos frente a *Brucella*. Debido al elevado grado de hemolisis de las muestras, no fue posible utilizar técnicas de aglutinación como la prueba de aglutinación rápida con antígeno rosa de Bengala (RBT). Por otra parte, la inexistencia de técnicas específicas para la detección de anticuerpos frente *Brucella* spp. en liebres nos forzó a desarrollar un ELISA indirecto (iELISA) para el diagnóstico de la brucelosis en liebres.

3.3.2.1.1.- Obtención de sueros positivos y negativos de referencia

Ante la ausencia de sueros *gold standard* de liebre o de poblaciones de animales domésticos relacionadas filogenéticamente, tuvimos que preparar una colección de sueros de referencia para el desarrollo del mencionado iELISA y la selección del punto de corte. Como fuente de animales utilizamos liebre europea *Lepus europaeus* de la granja Larrasal de cría en cautividad y ubicada en Alsasua (Navarra). Por el tipo de cría intensiva, la ausencia de signos clínicos compatibles, y el resultado del muestreo aleatorio realizado en algunos animales (ver más adelante), consideramos que se trataba de una explotación libre de brucelosis, y por tanto, ideal para la selección de los animales. Las liebres europeas de esta granja proceden de las capturadas en su día en estado salvaje del medio natural en las provincias de Álava y Navarra, y la granja seleccionada forma parte del proyecto de restablecimiento de la liebre europea en el norte de la península ibérica, y que promueve la asociación Erbi Europar. Para asegurarnos de que se trataba de una explotación libre de brucelosis, realizamos un estudio serológico sobre un muestreo representativo de animales. Las muestras de suero fresco obtenidas (por tanto, libres de hemolisis) nos permitieron realizar la prueba estándar de RBT (Nielsen, 2012), que resultó negativa en todos los casos, reforzando de esta manera nuestra hipótesis que la granja seleccionada se encontraba libre de la infección. Un total de 11 liebres fueron adquiridas para la realización de nuestra

experiencia, de las que 5 animales adultos (3 machos y 2 hembras) fueron seleccionados para la experiencia de obtención de suero hiperinmune y otros 6 (5 hembras y 1 macho) fueron inoculadas con suero salino estéril y usados como control del experimento y como población negativa de referencia.

3.3.2.1.2.- Preparación del inóculo

Para la obtención de sueros hiperinmunes, las 5 liebres seleccionadas fueron inmunizadas con una suspensión (conteniendo 5×10^{11} UFC/ml) de *B. suis* biovar 2 inactivadas en adyuvante incompleto de Freund. Para la preparación del inóculo, una cepa del haplotipo ibérico mayoritario (Muñoz *et al.*, 2010) de *B. suis* biovar 2, y recientemente aislada de un brote de brucelosis porcina en el laboratorio del CITA, fue sembrada en 4 placas de Blood Agar Base (BAB) durante 48 h a 37°C en una atmósfera conteniendo un 5% de CO₂. Las bacterias crecidas fueron recogidas mediante el lavado de la primera placa con 2,5 ml de solución salina estéril (PBS 10 mM, pH 7,2; 0,85% ClNa), transfiriendo toda la suspensión obtenida a la segunda placa y recogiendo la suspensión resultante en un tubo estéril. La misma operación fue realizada con las otras dos placas. Al final de este proceso obtuvimos aprox. 8 ml de una suspensión madre (SM) de *B. suis* biovar 2. La concentración de dicha SM fue ajustada por espectrofotometría para contener 10^{12} UFC/ml, y esta concentración fue comprobada retrospectivamente mediante dilución, siembra y recuento en placas. En nuestras condiciones, una absorbancia de 0.170 a 600 nm se corresponde a suspensiones conteniendo aproximadamente 10^9 UFC/ml. Una vez preparada la SM precisa, las bacterias fueron inactivadas añadiendo un 30% de formaldehído comercial e incubando la suspensión durante 72 h en agitación a 4°C, comprobando entonces su esterilidad mediante siembra directa en una placa de BAB, incubada durante 48 h a 37°C en una atmósfera conteniendo un 5% de CO₂. Una vez inactivada la suspensión y comprobada su esterilidad, esta fue centrifugada a 12.000 rpm durante 15-20 minutos, recogiendo el precipitado en solución salina estéril y lavándolo de nuevo en solución salina estéril, repitiendo la operación 4 veces para eliminar el formaldehído. El precipitado del último lavado se recogió en el mismo volumen inicial de solución salina que tenía la SM de modo que la suspensión resultante contuviese 10^{12} UFC/ml. Como último paso antes de la inoculación a las liebres, a cada alícuota de suspensión bacteriana inactivada se le añadió el mismo volumen (dilución 1:1) de adyuvante incompleto de Freund (Ref. F5506;

Sigma-Aldrich; USA). De esta manera, cada liebre fue inoculada con 1 ml de inóculo, conteniendo un total de 5×10^{11} UFC de *B. suis* biovar 2.

3.3.2.1.3.- Procedimiento de obtención de sueros e hiperinmunización

Todas las liebres fueron identificadas individualmente e inmovilizadas de manera que quedara accesible una de las dos orejas. La zona de elección para realizar la extracción de sangre previa a la inoculación fue la arteria central de la oreja, procediendo previamente a su limpieza y desinfección. En la zona de la arteria se aplicaron unas gotas de alcohol para facilitar una extracción de sangre lo más aséptica posible. La muestra de sangre se tomó con una aguja del calibre 20G x 2,5 cm con una jeringa de 5 ml, consiguiendo aproximadamente 4 ml/animal. La sangre recogida en tubos se dejó coagular para después centrifugarla durante 10 minutos a 800-1.000g y obtener el suero, que se almacenó en viales de plástico a -20°C. Tras la toma de sangre, cada una de las 5 liebres fue inoculada inmediatamente por vía subcutánea con 1 ml del inóculo previamente preparado (ver arriba). Las restantes 6 liebres usadas como control negativo fueron sometidas a la misma extracción de sangre, e inoculadas subcutáneamente con 1 ml de solución salina estéril (PBS 10 mM, pH 7,2; 0,85% ClNa).

Puesto que las muestras de suero eran de alta calidad y sin ningún grado de hemolisis, todos los sueros pudieron ser analizados mediante la técnica de RBT (Davies, 1971; Nielsen, 2012), que se considera adecuada para la detección de anticuerpos frente a todas las especies lisas de *Brucella* en la práctica totalidad de especies de mamíferos (Garin-Bastuji & Blasco, 1997). Al igual que en el muestreo aleatorio realizado en la granja previo a la compra de las liebres, la totalidad de animales resultó negativa en la prueba de RBT, confirmando que se trataba de liebres libres de la infección.

Quince días tras la primera inoculación se regresó a la granja y se realizó la exploración de las liebres inoculadas para comprobar su estado. Se procedió a una segunda extracción de sangre de todas ellas de igual manera que se ha descrito antes. Tras dicha extracción todas las liebres fueron re-inoculadas de igual manera que como se ha descrito antes, con 1 ml de inóculo vacunal o 1 ml de solución salina estéril por vía subcutánea. Los sueros obtenidos en esta extracción fueron analizados de igual manera que en el caso anterior, resultando ya positivos en la prueba de RBT aquellos sueros de las liebres inoculadas con la suspensión de *B. suis*, manteniéndose negativas los sueros

de las liebres inoculadas con solución salina, confirmando por tanto la validez del protocolo de inmunización.

A los 15 días de la segunda inoculación todas las liebres fueron sacrificadas (sobredosis de barbitúrico vía endovenosa) para obtener la máxima cantidad posible de suero hiperinmune, y además, se tomaron muestras de diferentes tejidos y órganos para su posterior estudio histológico y bacteriológico. Los sueros obtenidos en esta última extracción fueron analizados también como se ha indicado antes mediante la técnica de RBT, resultando positivos todos los sueros de las liebres hiperinmunizadas, manteniéndose negativos todos los sueros de las liebres usadas como control e inoculadas con solución salina.

3.3.2.1.4.- Puesta a punto del método iELISA con sueros de liebre

El antígeno utilizado fue el mismo que el usado en el iELISA desarrollado para la detección de anticuerpos en el jabalí (Muñoz *et al.*, 2010). Se trata de un extracto antigénico que contiene mayoritariamente lipopolisacarido liso (LPS-S) de la cepa de referencia *B. melitensis* 16M (Leong *et al.*, 1970). La adsorción del extracto antigénico se llevó a cabo en placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano (Maxisorp Nunc A/S, Roskilde, Dinamarca). Para la adsorción del antígeno, varias concentraciones de antígeno (desde 1 a 20 µg/ml) fueron preparadas en tampón fosfato salino estéril (PBS; 0.01M, ClNa 0.15M y pH 7.2) y distribuidas a razón de 100 µl por pocillo. Se cubrieron las placas con tapas adhesivas para evitar la evaporación y la adsorción se realizó a 4°C durante toda la noche. El antígeno no adherido a la placa se retiró mediante tres lavados con PBS-Tween 20 (Sigma; USA) al 0,05%.

Para determinar las condiciones óptimas del iELISA, se realizó una serie de ensayos preliminares con distintas concentraciones de antígeno y suero, diferentes conjugados y tiempos de lectura. Como primer paso se testó un panel representativo de sueros, compuesto por los 10 sueros de la población positiva (extraídos tras la primera (n=5) y segunda (n=5) hiperinmunización con células inactivadas de *B. suis* biovar 2 -ver arriba-) y los 11 sueros de las liebres antes de la inmunización (liebres como control negativo mas las liebres antes de la hiperinmunización con células inactivadas de *B. suis* biovar 2). Como conjugados, se utilizaron: 1) un antisuero policlonal obtenido en cabra frente a IgG de conejo, y conjugado con peroxidasa (GAR/IgG (H+L)/PO. Nordic

Immunological Laboratories, Tilburg, Holanda) y 2) tres proteínas recombinantes conjugadas con peroxidasa (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, EE.UU): Proteína G (Protein G/HRP), Proteína AG (Protein AG/HRP) y Proteína A (Protein A/HRP).

Los 10 sueros obtenidos tras la primera (n=5) y la segunda (n=5) inmunización fueron usados por duplicado (n=20) como población control positiva para la determinación del punto de corte óptimo en el iELISA. Los sueros (n=11) obtenidos de las liebres no inmunizadas en el momento de su sacrificio al final del ensayo (n=6) mas los sueros de las liebres antes de la hiperinmunización (n=5) fueron usados como control negativo con la misma finalidad. En todos los casos, los sueros fueron diluidos al duplo desde 1/25 hasta 1/200 en PBS-Tween y distribuidos por duplicado en las placas a razón de 100 µl por pocillo, previamente adsorbido con las diferentes concentraciones de antígeno. Cada placa se cubrió con una tapa adhesiva y tras una incubación a 37°C durante 45 minutos, se realizaron 3 lavados con PBS-Tween para eliminar los anticuerpos no reaccionantes. A continuación en cada pocillo se dispensó un volumen de 100 µl de diferentes diluciones de los distintos conjugados. El conjugado policlonal anti-IgG de conejo se ensayó a diluciones 1/1.000, 1/2.000, 1/5.000 y 1/10.000 y cada una de las proteínas recombinantes (A, G y A/G), a razón de 0,1 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,4 µg/ml y 0,8 µg/ml, todos ellos diluidos en PBS-Tween.

Las diferentes placas con los conjugados se incubaron a 37°C durante 45 minutos y se sometieron a 3 lavados con PBS-Tween. En cada placa de conjugado se introdujo un control positivo interno según el tipo de conjugado. Para el revelado de las reacciones antígeno-anticuerpo se añadió un volumen de 100 µl/pocillo de una solución conteniendo 0,11 mg/ml de ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzo-tiazolín-6-sulfónico (ABTS, Sigma; USA) en tampón citrato 0,05M (pH 4) y 0,004% de H₂O₂, y se incubaron las placas en agitación a temperatura ambiente. La absorbancia (DO) fue medida a 405 nm en un espectrofotómetro (Multiskan RC; Thermo Labsystems, Vantaa, Finlandia) transcurridos 10, 15 y 25 minutos.

Teniendo en consideración el promedio de las DD.OO. obtenidas en las diferentes condiciones con los sueros controles positivos y negativos, se seleccionaron aquellas condiciones que permitían una mejor resolución para diferenciar ambas poblaciones de sueros. Una vez seleccionadas las condiciones óptimas del iELISA, un total de 261 sueros de liebre obtenidos en campo fueron analizados mediante esta técnica.

3.3.2.2.- Estudio bacteriológico

Todas las muestras de tejido tomadas de animales que resultasen positivas en la técnica de iELISA, deberían ser sometidas a cultivo microbiológico, utilizando la misma rutina y métodos que los descritos en el caso del jabalí. Además como procedimiento de rutina, e independientemente de sus resultados serológicos, se estudiarían también bacteriológicamente todas las muestras de liebres europeas, fuesen cazadas o encontradas muertas, así como también todas las muestras de liebres europeas obtenidas con anterioridad a nuestro trabajo y mantenidas congeladas en la FVUZ. Al no resultar positiva serológicamente ninguna de las liebres ibéricas analizadas, tan solo fueron analizadas bacteriológicamente un total de 26 liebres europeas, 18 de las cuales fueron obtenidas durante el periodo de estudio.

Por otra parte, e independientemente de que resultaron todas negativas en el iELISA, se estudiaron bacteriológicamente las muestras tomadas de liebres ibéricas en aquellas comarcas en las que fue identificada una elevada seroprevalencia de brucelosis en el jabalí. En consecuencia, un total de 105 liebres ibéricas fueron estudiadas bacteriológicamente, todas ellas obtenidas durante el periodo de estudio. En vista de los resultados negativos obtenidos y por razones de logística, decidimos no analizar bacteriológicamente la totalidad de muestras de liebres ibéricas tomadas a lo largo del estudio.

3.3.2.3.- Estudio anatomopatológico

Durante la toma de muestras en campo y las necropsias, se incidió en la búsqueda de lesiones macroscópicas compatibles con brucelosis en la liebre (Stërba, 1982; Gyuranecz *et al.*, 2011). Tanto los órganos como las vísceras de las liebres se sometían a inspección macroscópica antes del cultivo bacteriológico. Los órganos inspeccionados macroscópicamente fueron principalmente el aparato reproductor, el bazo y el hígado. Un total de 107 vísceras de liebre fueron inspeccionadas.

De las liebres encontradas muertas en el medio natural y trasladadas a la FVUZ, fueron realizadas 21 necropsias (7 liebres ibéricas y 14 liebres europeas), con la toma de datos biométricos, la inspección macroscópica y el estudio histológico. El procesado y la

tinción histológica de las muestras de liebre siguieron el mismo procedimiento que el empleado en los tejidos de jabalí, en el apartado anterior.

3.4.- ESTUDIO DE LA SEROPREVALENCIA DE BRUCELOSIS EN LOS PERROS DE CAZA

3.4.1.- OBTENCIÓN Y ORIGEN GEOGRÁFICO DE LAS MUESTRAS

De igual manera que en los casos anteriores, la obtención de muestras de perros de caza se realizó con la colaboración de cazadores y responsables de rehalas de perros. Durante la temporada de caza tanto mayor como menor, se realizaron contactos con cazadores, presidentes de cotos y propietarios de rehalas, explicándoles nuestro interés por obtener muestras de suero de perros que cazaban los jabalíes que nosotros muestreábamos. La extracción de sangre de perros de caza se realizó de la vena cefálica que discurre cranealmente por encima de la extremidad anterior. Todos los perros sometidos a extracción, fueron identificados por su nombre y el número de chip, también se anotó la edad, el sexo y la modalidad de caza. Además de estos datos, el propietario de los perros o la persona responsable del mantenimiento de los mismos fue sometida a una encuesta epidemiológica sobre aspectos higiénico-sanitarios, alimentación y reproducción.

Para realizar la extracción se inmovilizó cada perro en posición de decúbito esternal o sentado, después se aplicó alcohol al 70% en la zona de punción para limpiar la zona e identificar mejor la vena cefálica. Realizando un poco de presión por encima de la zona de punción, bloqueamos la vena cefálica y pinchamos con una palomilla (aguja con alargador, calibre 18G) logrando extraer 10 ml de sangre con una jeringa de 10 ml. La sangre se depositó en un tubo de plástico de 10 ml para obtención de suero. Tras la coagulación la sangre fue centrifugada durante 10 minutos a 800-1.000g y los sueros fueron almacenados en viales de plástico y conservados refrigerados o congelados a -20°C. Todos los perros se sometieron a una exploración física en busca de signos clínicos compatibles con brucelosis (Wanke, 2004).

Fueron visitadas un total de 37 rehalas de perros repartidas por el territorio aragonés, además algunas comarcas fueron muestreadas con varias rehalas. Pese a ello,

lamentablemente en algunas comarcas no fue posible tomar muestras de perros (figura 7).

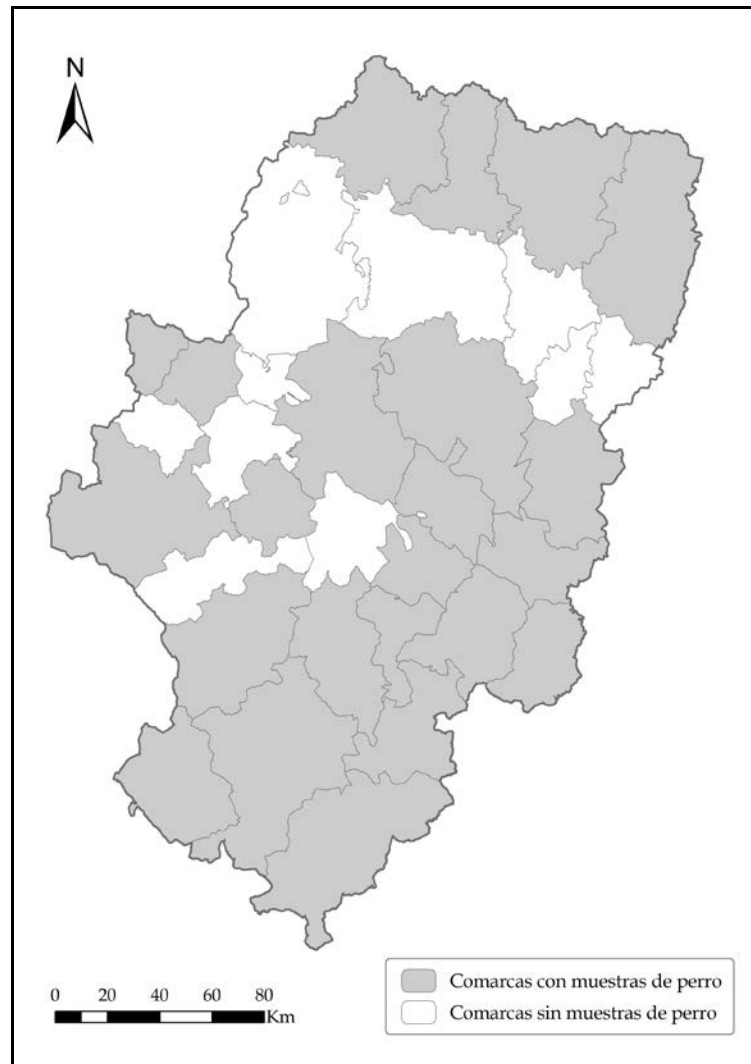


Figura 7: Distribución comarcal de muestras de perro en Aragón.

Todos fueron perros de caza, tanto de caza mayor (ciervo, jabalí) como de caza menor (conejo, liebre y perdiz). En conjunto un total de 575 muestras de suero fueron tomadas a lo largo del estudio (figura 8).

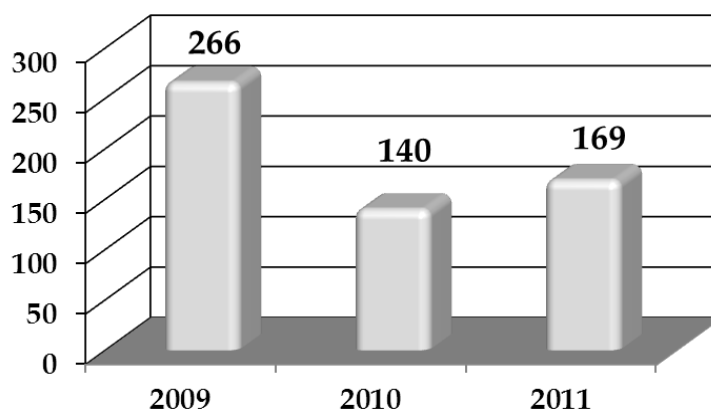


Figura 8: Número de sueros de perros de caza obtenidos por año.

Las muestras fueron clasificadas según su origen geográfico (comarca), tipo de caza y alimentación. Ante el desconocimiento de la situación de la brucelosis en perros de caza en Aragón, se consideró oportuno intentar priorizar la toma de muestras de aquellas comarcas con elevada seroprevalencia y mayor frecuencia de aislamientos de *B. suis* biovar 2 en el jabalí. La distribución de perros y rehalas por comarcas se presenta en la tabla 4.

Comarcas	Nº de perros	Nº de rehalas
Alto Gállego	5	1
Andorra-Sierra de Arcos	16	1
Bajo Aragón	32	2
Bajo Aragón-Caspe	39	2
Bajo Cinca	40	2
Bajo Martín	8	1
Campo de Borja	34	3
Campo de Cariñena	24	1
Comunidad de Calatayud	38	2
Comunidad de Teruel	19	1
Cuencas Mineras	40	2
D.C. Zaragoza	40	3
Gúdar-Javalambre	18	1
Jiloca	38	2
La Jacetania	22	1
La Ribagorza	48	3
Los Monegros	19	2
Maestrazgo	2	1
Matarraña	11	1
Ribera Baja del Ebro	20	1
Sierra de Albarracín	21	1
Sobrarbe	20	1
Tarazona y el Moncayo	21	2
Total	575	37

Tabla 4: Número y procedencia de perros de caza por comarca.

En los perros muestreados la edad y el sexo fue obtenido de la cartilla oficial canina, donde aparecen el sexo, edad, raza y número de chip. Para la edad, aquellos animales con más de 6 años fueron identificados como *viejos*. Los perros que no habían salido a

cazar fueron identificados como *juveniles* y el resto fueron *adultos*. La edad de los perros pudo verificarse en 544 animales: 25 *viejos*, 465 *adultos* y 54 *juveniles*. El sexo se verificó en 541 animales: 354 machos y 187 hembras. Los perros que solo cazaban jabalí fueron 359, mientras que aquellos que también se utilizan en batidas de ciervo y jabalí fueron 211, quedando por tanto tan solo 5 perros que solo fueron utilizados en caza menor. Los perros que eran frecuentemente alimentados por sus cuidadores con carne o vísceras de jabalí fueron un total de 351 (61,04%), mientras que aquellos que recibían una alimentación convencional sin recibir subproductos de la caza del jabalí fueron 224 (38,96%).

3.4.2.- METODOLOGÍA DE ESTUDIO

Para determinar la situación de la brucelosis en los perros de caza, las muestras tomadas fueron estudiadas mediante técnicas serológicas y bacteriológicas.

3.4.2.1.- Determinación de anticuerpos inducidos por infecciones por especies lisas de *Brucella*

Puesto que la calidad de las muestras de suero tomadas en los perros fue muy buena, para determinar la presencia de anticuerpos frente a una potencial infección por *B. suis* se realizó la técnica de rosa de Bengala (RBT) estándar y modificada (Blasco *et al.*, 1994; Nielsen, 2012), aceptada como una técnica universal para el diagnóstico de brucelosis en todas especies de mamíferos (Garin-Bastuji & Blasco, 1997). Si el suero resultaba positivo para las dos técnicas, se procedía a la realización de diluciones seriadas al duplo del suero en PBS estéril. Para cada una de estas diluciones se realizaba la técnica de RBT estándar, hasta detectar la dilución en la cual no se apreciaba aglutinación, pudiendo de esta manera realizar la titulación de las reacciones positivas producidas.

3.4.2.2.- Estudio bacteriológico

Aquellos perros que resultaron positivos en RBT, y que sus propietarios nos lo permitieron, fueron sometidos a una extracción de sangre adicional en condiciones estériles para realizar un hemocultivo e intentar el aislamiento bacteriológico. Siempre que fue posible, se realizó en aquellos perros con títulos más altos en la prueba de aglutinación RBT, aunque no fue posible realizar un hemocultivo en todos los casos, bien por problemas de logística o, principalmente, por la falta de disposición de sus propietarios. En consecuencia, solamente 4 perros presentando positividad en la prueba de RBT pudieron ser sometidos a una extracción de sangre para intentar el hemocultivo.

La obtención de sangre entera para hemocultivo se realizó mediante la técnica antes descrita pero extremando la desinfección de la zona, así como el material utilizado, para evitar contaminaciones. Después de la palpación de la vena, la piel se lavó con una solución jabonosa y la desinfección se realizó con clorhexidina alcohólica aplicándolo en forma excéntrica desde el sitio de punción elegido. Además, también se realizó la desinfección con etanol de los tapones de los tubos de vacío estériles usados. Mediante una palomilla de extracción se tomaron siempre uno o dos tubos de 10 ml de sangre entera en tubos de vacío estériles conteniendo citrato de sodio como anticoagulante (Yagupsky, 1999). Simultáneamente a la extracción para el hemocultivo, se realizó la identificación de los 4 perros y se sometió a cada animal a una exploración física exhaustiva en busca de signos clínicos compatibles, como dermatitis escrotal, epididimitis, linfadenitis generalizada, orquitis, uveítis (Carmichael, 1990; Wanke, 2004). Además se interrogó al propietario acerca de la salud del perro, sobre abortos tardíos o infertilidad tanto en machos como en hembras, así como su pauta de alimentación.

Los tubos de sangre entera fueron llevados al laboratorio para su cultivo bacteriológico en el menor tiempo posible tras la extracción. Tras la descontaminación del tapón de goma, los tubos de sangre eran abiertos dentro de una cabina de flujo laminar para evitar la contaminación de la sangre y del medio de cultivo. Cada muestra de sangre fue inoculada en al menos dos frascos conteniendo 150 ml de caldo de Tripticasa Soja (TSB, Oxoid, UK) estéril. Tras agitar cuidadosamente para homogenizar el contenido, los frascos fueron incubados durante al menos 30 días a 37°C en atmósfera con un 5-10% CO₂. Todos los frascos inoculados fueron observados diariamente en busca de signos que indicasen crecimiento bacteriano. A intervalos semanales de incubación se

sembraron 5 placas de BAB con 0,5 ml del contenido del frasco en cada una de las placas. Todas las placas de BAB se incubaron en estufa durante 7 días a 37°C con 5-10% de CO₂. Estas placas fueron revisadas periódicamente en busca de crecimiento bacteriano, descartándose a los 7 días en ausencia de crecimiento.

3.5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todas las variables (especie, edad, sexo, la comarca de procedencia y la temporada de caza) y los correspondientes resultados serológicos y bacteriológicos fueron introducidos en una base de datos realizada con el programa FileMaker Pro. Algunos de estos datos fueron exportados a hojas de cálculo Excel 2010 para su tratamiento estadístico. Debido a que se trabajó con variables cualitativas, se prepararon las correspondientes tablas de contingencia para su análisis. La prueba de χ^2 o la prueba de razón de verosimilitud fueron aplicadas a dichas tablas de contingencia con el objeto de probar la existencia o no de diferencias significativas entre las diferentes variables.

Para realizar los cálculos estadísticos se utilizó el programa estadístico IBM SPSS 19.0 para Windows, la hoja de cálculo Microsoft Excel 2010 y la base de datos FileMaker Pro 11. Se estableció un 5% ($p < 0,05$) como nivel de significación estadística.

RESULTADOS

4.- RESULTADOS

4.1.- RESULTADOS EN EL JABALÍ

4.1.1.- RESULTADOS SEROLÓGICOS

Un total de 341 de los 1.569 sueros de jabalí analizados resultaron positivos en el iELISA, obteniéndose por tanto una seroprevalencia del 21,73% (IC 95%: 19,76-23,84). Cuatro de los sueros positivos se correspondían con animales encontrados muertos y los restantes 337 con animales cazados.

4.1.1.1.- Distribución de la seroprevalencia de brucelosis en jabalí en función de la temporada de caza y distribución por comarcas

La seroprevalencia obtenida por temporada de caza se presenta en la tabla 5.

Temporada	Nº sueros	Nº sueros positivos	Seroprevalencia	IC 95%
1ª Temporada 2008-2009	448	82	18,30%	15,00-22,15
2ª Temporada 2009-2010	504	122	24,21%	20,67-28,13
3ª Temporada 2010-2011	313	62	19,81%	15,77-24,58
4ª Temporada 2011-2012	304	75	24,67%	20,16-29,81
Total	1.569	341	21,73%	19,76-23,84

Tabla 5: Número de jabalíes seropositivos en las diferentes temporadas de caza.

Como puede apreciarse, la seroprevalencia se mantuvo siempre en valores próximos al 20% de los animales muestreados, no apreciándose diferencias significativas entre las diferentes temporadas de caza estudiadas ($p=0,068$).

En la tabla 6 se presenta la distribución de la seroprevalencia por comarcas en el conjunto del periodo de estudio.

Comarcas	Nº sueros	Nº sueros positivos	Seroprevalencia	IC 95%
Alto Gállego	140	17	12,14%	7,72-18,59
Andorra-Sierra de Arcos	13	2	15,38%	4,33-42,24
Aranda	19	5	26,32%	11,81-48,79
Bajo Aragón	32	4	12,50%	4,97-28,07
Bajo Aragón-Caspe	19	9	47,37%	27,33-68,29
Bajo Cinca	32	9	28,13%	15,56-45,37
Bajo Martín	18	5	27,78%	12,50-50,87
Campo de Belchite	45	15	33,33%	21,36-47,93
Campo de Borja	25	7	28,00%	14,28-47,58
Campo de Cariñena	29	3	10,34%	3,58-26,39
Campo de Daroca	20	5	25,00%	11,19-46,87
Cinca Medio	22	8	36,36%	19,73-57,05
Cinco Villas	141	29	20,57%	14,72-27,98
Comunidad de Calatayud	21	5	23,81%	10,63-45,09
Comunidad de Teruel	15	3	20,00%	7,05-45,19
Cuencas Mineras	12	1	8,33%	1,49-35,39
D.C. Zaragoza	38	11	28,95%	17,00-44,76
Gúdar-Javalambre	47	7	14,89%	7,41-27,69
Hoya de Huesca	33	4	12,12%	4,82-27,33
Jiloca	7	0	0,00%	0,00-35,43
La Jacetania	205	21	10,24%	6,80-15,15
La Litera	15	8	53,33%	30,12-75,19
La Ribagorza	175	55	31,43%	25,01-38,64
Los Monegros	41	11	26,83%	15,69-41,93
Maestrazgo	20	2	10,00%	2,79-30,10
Matarraña	24	3	12,50%	4,34-31,00
Ribera Baja del Ebro	24	10	41,67%	24,47-61,17
Sierra de Albarracín	28	6	21,43%	10,21-39,54
Sobrarbe	236	47	19,92%	15,32-25,47
Somontano de Barbastro	15	5	33,33%	15,18-58,29
Tarazona y el Moncayo	57	24	42,11%	30,19-55,02
Valdejalón	1	0	0,00%	0,00-79,35
Total	1.569	341	21,73%	19,76-23,84

Tabla 6: Distribución de la seroprevalencia de brucelosis en jabalí en las diferentes comarcas estudiadas.

Tan solo hubo dos comarcas (Jiloca y Valdejalón) con nula seroprevalencia, pero el número de animales muestreados fue muy pequeño en ambos casos. En el resto de comarcas muestreadas se puso en evidencia una elevada seroprevalencia, que se mantuvo de forma más o menos constante a lo largo de las diferentes temporadas de caza (resultados no mostrados).

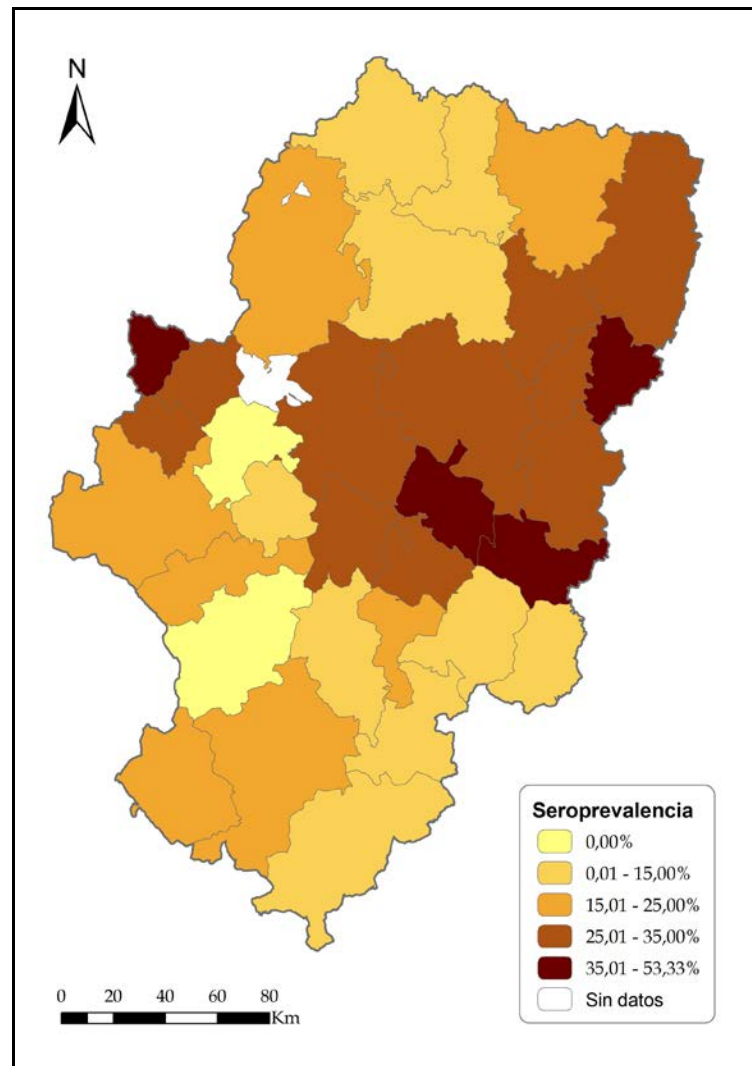


Figura 9: Distribución espacial de seroprevalencias en las comarcas de Aragón.

En la figura 9 se presenta la distribución espacial de la seroprevalencia por comarcas en el conjunto del periodo de estudio, mostrando una elevada heterogeneidad.

4.1.1.2.- Distribución de la seroprevalencia de brucelosis en jabalí en función de la edad y sexo

En la tabla 7 se presenta la seroprevalencia en función del sexo de los jabalíes analizados, en aquellos casos en los que este pudo determinarse. La seroprevalencia fue significativamente mayor ($p=0,001$) en machos que en hembras.

Sexo	N° sueros	N° sueros positivos	Seroprevalencia	IC 95%
Macho	594	152	25,59%	22,24-29,25
Hembra	596	107	17,95%	15,08-21,24
Total	1.190	259	21,76%	19,51-24,20

Tabla 7: Distribución de la seroprevalencia según el sexo.

En la tabla 8 se presenta la seroprevalencia en función de la edad de los jabalíes analizados, en aquellos casos en los que esta pudo establecerse.

Edad	N° sueros	N° sueros positivos	Seroprevalencia	IC 95%
Adulto	635	184	28,98%	25,58-32,62
Joven	294	29	9,86%	6,96-13,81
Jabato	53	4	7,55%	2,97-17,86
Total	982	217	22,09%	19,61-24,80

Tabla 8: Distribución de la seroprevalencia según la edad.

Como puede apreciarse, la seroprevalencia en los jabalíes adultos fue más elevada ($p < 0,001$) que la obtenida en juveniles o en jabatos.

En la tabla 9 se exponen los resultados de seroprevalencia en función del sexo y edad, en aquellos casos en los que ambos datos pudieron establecerse con precisión.

Edad	Sexo								
	Macho			Hembra			Total		
	N°	Sero-prevalencia	IC 95%	N°	Sero-prevalencia	IC 95%	N°	Sero-prevalencia	IC 95%
Adulto	302	34,43%	29,30-39,96	324	24,38%	20,03-29,34	626	29,23%	25,81-32,91
Joven	137	10,95%	6,75-17,28	147	8,84%	5,24-14,54	284	9,86%	6,91-13,88
Jabato	22	9,09%	2,53-27,82	28	7,14%	1,98-22,65	50	8,00%	3,15-18,84
Total	461	26,25%	22,44-30,45	499	18,84%	15,65-22,50	960	22,40%	19,87-25,14

Tabla 9: Distribución de la seroprevalencia de brucelosis en función de la edad y sexo de los jabalíes analizados.

Como se aprecia en dicha tabla, y como ya se evidenciaba en la tabla 7 anterior, la seroprevalencia fue significativamente mayor ($p < 0,001$) en los machos que en las hembras. Sin embargo, cuando los resultados se estratificaron por clases de edad, la seroprevalencia fue significativamente mayor ($p = 0,006$) en los machos que en las hembras pero solo en el caso de los animales adultos, ya que no existieron diferencias significativas entre sexos en los animales juveniles ($p = 0,552$), ni en los jabatos ($p = 0,802$).

4.1.2.- RESULTADOS BACTERIOLÓGICOS

De los 341 animales que presentaron un resultado serológico positivo, tan solo se pudo disponer de muestras adecuadas para cultivo en 318 casos. Además, se estudiaron bacteriológicamente muestras de otros 11 animales seronegativos, bien por presentar lesiones macroscópicas compatibles. En conjunto, de estos 329 jabalíes sometidos a estudio bacteriológico, un total de 107 (todos ellos seropositivos) fueron encontrados infectados y las 107 cepas aisladas identificadas todas como *B. suis* biovar 2 (ver apartado 4.1.2.4 más adelante). La inmensa mayoría de cepas (n=104) se aislaron en animales cazados y tan solo 3 animales encontrados muertos resultaron positivos en cultivo. Finalmente, la totalidad de muestras de los 50 animales seronegativos sometidos a estudio bacteriológico resultaron negativas en cultivo (resultados no mostrados), demostrándose así la excelente especificidad de la estrategia empleada.

4.1.2.1.- Frecuencia de aislamiento de *B. suis* biovar 2 en jabalí en función de la temporada de caza y distribución por comarcas

La distribución de los aislamientos obtenidos por temporada de caza se presenta en la tabla 10.

Temporada	Nº casos analizados	Nº cultivo positivo	Frecuencia de aislamiento	IC 95%
1º Temporada 2008-2009	73	13	17,81%	10,71-28,12
2º Temporada 2009-2010	124	52	41,94%	33,62-50,74
3º Temporada 2010-2011	59	23	38,98%	27,58-51,73
4º Temporada 2011-2012	73	19	26,03%	17,34-37,11
Total	329	107	32,52%	27,69-37,76

Tabla 10: Distribución de la frecuencia de aislamientos de *B. suis* biovar 2 por temporada de caza.

En la segunda temporada de caza, la frecuencia de cultivos positivos resultó significativamente mayor ($p=0,002$) que en el resto de temporadas. Con esta excepción, la frecuencia de aislamiento se mantuvo en valores muy similares a lo largo de todas las temporadas de caza estudiadas. La eficacia global de la sistemática utilizada fue moderada, ya que tan solo el 32,52% de los animales seropositivos estudiados bacteriológicamente resultaron en cultivo positivo.

La frecuencia de aislamientos de *B. suis* biovar 2 en las comarcas en las que se obtuvieron muestras adecuadas para estudio bacteriológico se presenta en la tabla 11.

Comarcas	Nº analizado	Nº cultivo positivo	Frecuencia de aislamiento	IC 95%
Alto Gállego	13	4	30,77%	12,68-57,63
Andorra-Sierra de Arcos	2	0	0,00%	0,00-65,76
Aranda	5	3	60,00%	23,07-88,24
Bajo Aragón	4	2	50,00%	15,00-85,00
Bajo Aragón-Caspe	9	2	22,22%	6,32-54,74
Bajo Cinca	9	4	44,44%	18,88-73,34
Bajo Martín	5	2	40,00%	11,76-76,93
Campo de Belchite	15	9	60,00%	35,75-80,18
Campo de Borja	7	4	57,14%	25,05-84,18
Campo de Cariñena	4	2	50,00%	15,00-85,00
Campo de Daroca	5	3	60,00%	23,07-88,24
Cinca Medio	8	3	37,50%	13,68-69,43
Cinco Villas	29	6	20,69%	9,85-38,39
Comunidad de Calatayud	5	2	40,00%	11,76-76,93
Comunidad de Teruel	4	2	50,00%	15,00-85,00
Cuencas Mineras	1	1	100,00%	20,65-100,00
D.C. Zaragoza	11	4	36,36%	15,17-64,62
Gúdar-Javalambre	7	2	28,57%	8,22-64,11
Hoya de Huesca	4	2	50,00%	15,00-85,00
La Jacetania	17	1	5,88%	1,05-26,98
La Litera	8	3	37,50%	13,68-69,43
La Ribagorza	50	14	28,00%	17,47-41,67
Los Monegros	11	8	72,73%	43,43-90,25
Maestrazgo	2	0	0,00%	0,00-65,76
Matarraña	3	2	66,67%	20,77-93,85
Ribera Baja del Ebro	10	6	60,00%	31,27-83,18
Sierra de Albarracín	4	1	25,00%	4,56-69,94
Sobrarbe	49	4	8,16%	3,22-19,19
Somontano de Barbastro	5	2	40,00%	11,76-76,93
Tarazona y el Moncayo	23	9	39,13%	22,16-59,21
Total	329	107	32,52%	27,46-37,58

Tabla 11: Número de cultivos de jabalí y frecuencia de aislamiento por comarca.

Con la excepción de las comarcas de Andorra-Sierra de Arcos y Maestrazgo (en las que tan solo se pudieron analizar 2 animales en cada caso), *B. suis* biovar 2 fue aislada en la totalidad de comarcas aragonesas en las que se analizaron muestras, si bien la frecuencia de aislamiento varió considerablemente en función del número de animales analizados. En aquellas comarcas en la que se estudió un número significativo de animales (15 o más) la frecuencia de aislamientos osciló entre un mínimo del 5,8% (La Jacetania) y un máximo del 60% (Campo de Belchite). En general, y en clara concordancia con la seroprevalencia identificada en el estudio serológico, la frecuencia de aislamiento de *B. suis* biovar 2 fue elevada en la práctica totalidad del territorio aragonés.

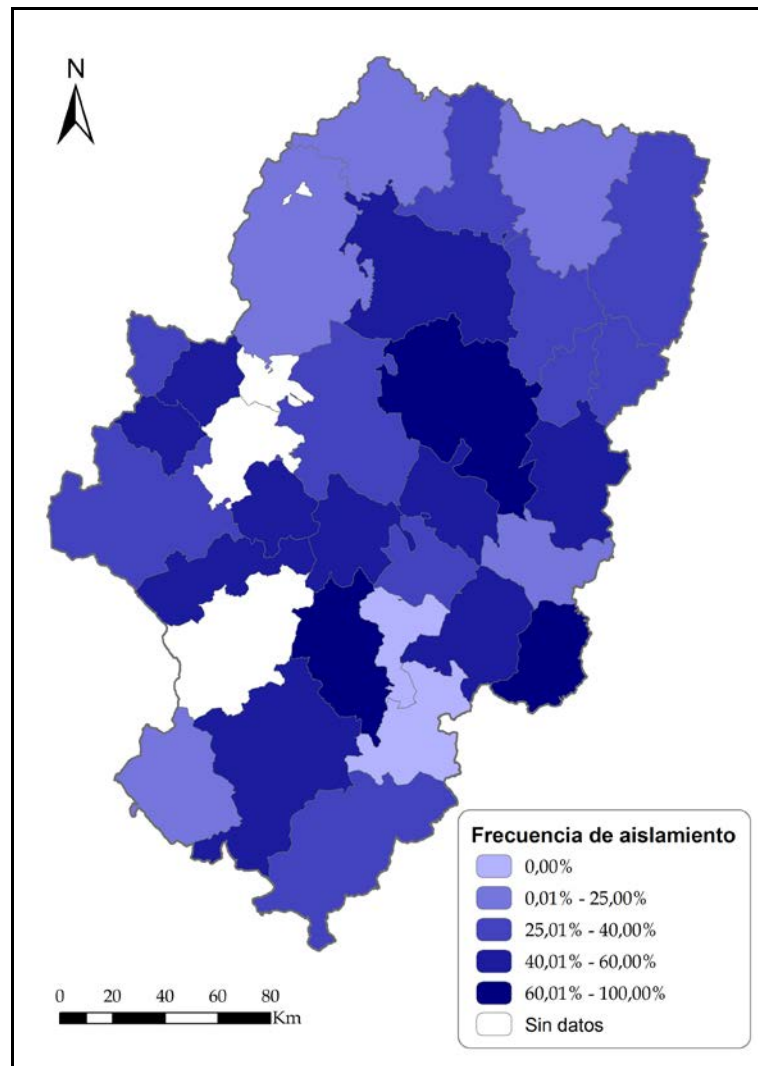


Figura 10: Distribución espacial de frecuencias de aislamiento en las comarcas de Aragón.

En la figura 10 se presenta la distribución espacial de las frecuencias de aislamiento por comarcas en el conjunto del periodo de estudio, no observando ningún patrón reseñable.

4.1.2.2.- Frecuencia de aislamiento de *B. suis* biovar 2 en función de la edad y sexo

En la tabla 12 se presenta la frecuencia de aislamiento de *B. suis* biovar 2 en función del sexo de los jabalíes analizados, en aquellos casos en los que este pudo determinarse. Pese a que los machos presentaban aparentemente una frecuencia de aislamiento algo más elevada que las hembras, no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre sexos ($p=0,22$).

Sexo	N° analizados	N° cultivo positivo	Frecuencia de aislamiento	IC 95%
Macho	144	58	40,28%	32,62-48,44
Hembra	107	35	32,71%	24,55-42,06
Total	251	93	37,10%	31,31-43,18

Tabla 12: Frecuencia de aislamiento de *B. suis* biovar 2 en función del sexo de los jabalíes examinados.

En la tabla 13 se presenta la frecuencia de aislamiento de *B. suis* biovar 2 en función de la edad de los jabalíes analizados, en aquellos casos en los que esta pudo determinarse.

Edad	N° analizado	N° cultivo positivo	Frecuencia de aislamiento	IC 95%
Adulto	181	68	37,36%	30,84-44,81
Joven	29	17	58,62%	40,74-74,49
Jabato	4	0	0,00%	0,00-48,99
Total	215	85	39,50%	33,24-46,20

Tabla 13: Frecuencia de aislamiento de *B. suis* biovar 2 en función de la edad de los jabalíes examinados.

Como puede apreciarse, aunque el tamaño de la muestra no fue demasiado elevado en los animales juveniles y jabatos, la frecuencia de aislamiento fue mayor ($p=0,013$) en los animales juveniles que en los animales adultos.

En la tabla 14 se presenta la frecuencia de aislamiento de *B. suis* biovar 2 en función del sexo y edad de los jabalíes analizados, en aquellos casos en los que estos datos pudieron determinarse con precisión. Los resultados se muestran estratificados por sexo y edad.

Edad	Sexo					
	Macho			Hembra		
	N°	Frecuencia de aislamiento	IC 95%	N°	Frecuencia de aislamiento	IC 95%
Adulto	102	41,18%	32,12-50,88	79	31,65%	22,45-42,55
Joven	15	60%	35,75-80,18	13	61,54%	35,52-82,29
Jabato	2	0%	0,00-65,76	2	0%	0,00-65,76
Total	119	42,86%	34,33-51,83	94	35,11%	26,22-45,17

Tabla 14: Frecuencia de aislamiento de *B. suis* biovar 2 en función de la edad y sexo de los jabalíes examinados.

Como puede apreciarse, y a diferencia de lo indicado antes para la edad (tabla 13), no hubo diferencias significativas en la frecuencia de aislamiento en función de los grupos de edad ni en los machos ($p=0,127$), ni en las hembras ($p=0,052$).

4.1.2.3.- Frecuencia de aislamiento de *B. suis* biovar 2 en jabalí en función del origen y naturaleza de la muestra analizada

En la tabla 15 se presenta la frecuencia de aislamiento en función de si la muestra analizada fue tomada por nosotros o bien era tomada por terceros. Como puede apreciarse claramente, la frecuencia de aislamiento disminuyó a más de la mitad ($p < 0,001$) cuando la muestra fue tomada por personas ajenas a nuestro grupo de investigación (APNs, guardas de caza y cazadores).

Origen de la muestra	Nº analizado	Nº cultivo positivo	Frecuencia de aislamiento	IC 95%
Equipo FVUZ	155	70	45,16%	37,54-53,02
Otros (APNs, Cazadores, etc.)	174	37	21,26%	15,84-27,93
Total	329	107	32,52%	27,46-37,58

Tabla 15: Frecuencia de aislamiento de *B. suis* biovar 2 en jabalíes en función de la toma de muestra.

En definitiva, la probabilidad (Odds Ratio) de obtener un cultivo positivo fue 3 veces superior cuando la muestra fue tomada por nosotros que cuando fue tomada por terceros.

La frecuencia de aislamiento de *B. suis* biovar 2 en función del tipo de tejido estudiado se presenta en la tabla 16.

Tejido	Nº muestras	Nº cultivo positivo	Frecuencia de aislamiento	IC 95%
Linfonodo mandibular	317	89	28,08%	23,41-33,26
Bazo	117	23	19,66%	13,47-27,77
Testículo	45	4	8,89%	3,51-20,73
Epidídimo	45	12	26,67%	15,96-41,04
Linfonodo escrotal	32	13	40,63%	25,52-57,74
Linfonodo mamario	31	11	35,48%	21,12-53,05
Glándula mamaria	3	2	66,67%	20,77-93,85
Útero	8	0	0%	0,00-32,44
Hígado	9	0	0%	0,00-29,92
Glándula bulbo-uretral	2	0	0%	0,00-65,76
Otras (pulmón y coagulo)	2	1	50%	9,45-90,55
Total	609	155	25,45%	22,15-29,06

Tabla 16: Frecuencia de aislamiento de *B. suis* biovar 2 en jabalíes en función del tipo de tejido analizado.

La frecuencia de aislamiento de *B. suis* biovar 2 fue muy elevada cuando se dispuso de la glándula mamaria, si bien el número de muestras analizadas fue muy reducido. Los linfonodos mamaros y escrotales resultaron en elevadas frecuencias de aislamiento, generalmente por encima del 30%. Las muestras más utilizadas para cultivo fueron el linfonodo mandibular y el bazo, y como puede apreciarse, la frecuencia de aislamiento en estos órganos fue del 28,08% y 19,6%, respectivamente. En el caso de los órganos

genitales del macho hubo también una relativamente elevada frecuencia de aislamiento, siendo algo mayor en el epidídimo que en el testículo. Por el contrario, no se obtuvo ningún aislamiento a partir del útero, si bien el número de muestras sembradas fue muy reducido.

La frecuencia de aislamiento de *B. suis* biovar 2 en función del número de muestras analizadas por animal se presenta en la tabla 17.

Número de muestras examinadas por animal	Nº animales	Nº animales cultivo positivo	Frecuencia de aislamiento	IC 95%
7	1	0	0%	0,00-79,35
6	4	3	75%	30,06-95,44
5	10	8	80%	49,02-94,33
4	26	17	65,38%	46,22-80,59
3	29	11	37,93%	22,69-56,00
2	80	27	33,75%	24,35-44,64
1	179	41	22,91%	17,36-29,06
Total	329	107	32,52%	27,46-37,58

Tabla 17: Frecuencia de aislamiento de *B. suis* biovar 2 en jabalíes en función del número de tejidos analizados.

Como se evidencia en la tabla anterior, la frecuencia de aislamiento fue aumentando paulatinamente conforme aumentaba el número de tejidos sembrados de cada animal. Cuando se sometieron a estudio bacteriológico entre 4 y 5 muestras de cada animal, la frecuencia de aislamiento fue muy elevada, oscilando entre el 65,38% y el 80%.

4.1.2.4.- Caracterización molecular de las cepas de *B. suis* biovar 2 aisladas en jabalí

Como se ha indicado anteriormente (ver 3.2.2.2. material y métodos), las 107 cepas aisladas en el jabalí fueron identificadas mediante pruebas microbiológicas convencionales, así como mediante "Bruce-ladder". La diferenciación de las distintas especies de *Brucella* en esta técnica se esquematiza en la figura 11.

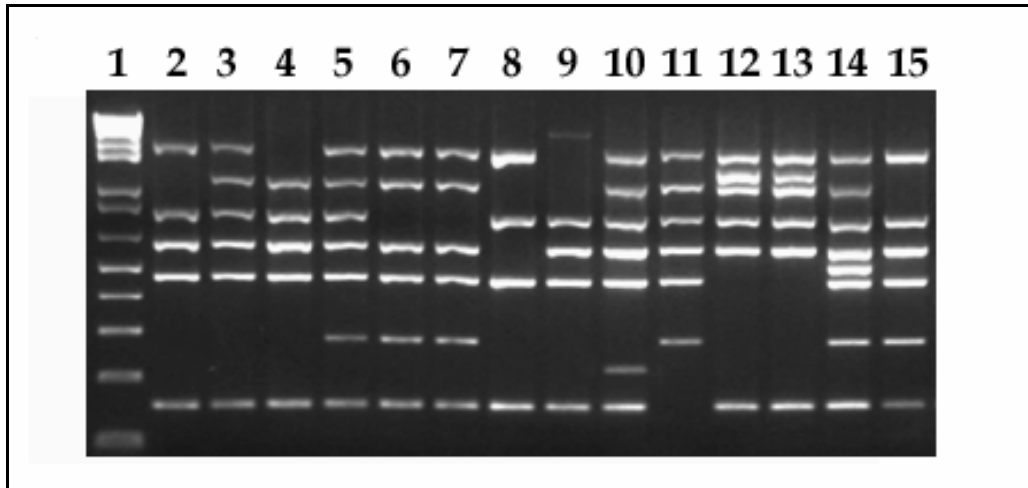


Figura 11: “Bruce-ladder” PCR multiplex. Línea 1, marcador de pesos moleculares de 100pb (Invitrogen Ltd.); línea 2, *B. abortus* biovar. 1 (cepa 2308); línea 3, *B. melitensis* biovar. 1 (cepa 16M); línea 4, *B. ovis* (cepa PA); línea 5, *B. suis* biovar. 1 (cepa 1330); línea 6 *B. canis* (cepa 6/66); línea 7 *B. canis* (cepa de campo); línea 8, *B. abortus* S19 (vacuna); línea 9, *B. abortus* RB51 (vacuna); línea 10, *B. melitensis* Rev.1 (vacuna); línea 11, *B. neotomae* (cepa SK33); línea 12, *B. pinipedialis* (cepa B2/94); línea 13, *B. ceti* (cepa B1/94); línea 14, *B. microti* (cepa 4915); línea 15, *B. inopinata* (cepa BO-01).

Además, la tipificación de todas las cepas de *B. suis* aisladas como biovar 2 se llevó a cabo también mediante “Suis-ladder”. En la figura 12 se esquematizan los resultados de esta técnica, que permite la diferenciación de las 5 biovariedades de *B. suis*.

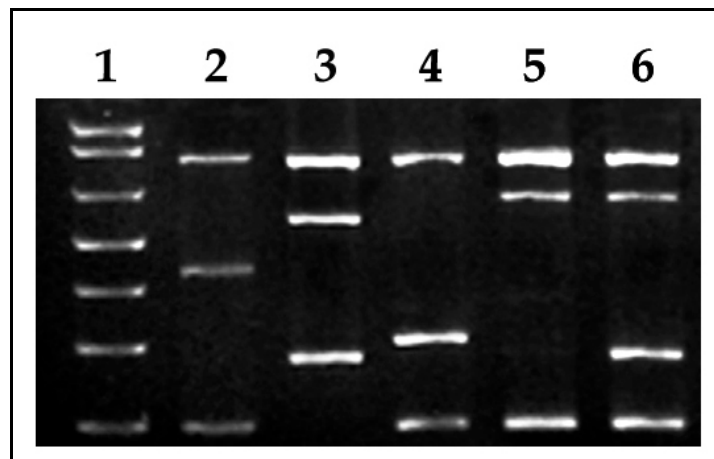


Figura 12: PCR multiplex “Suis ladder”. Línea 1, marcador de pesos moleculares de 100pb (Invitrogen Ltd.); línea 2, *B. suis* biovar 1 (cepa 1330); línea 3, *B. suis* biovar 2 (cepa Thomsen); línea 4, *B. suis* biovar 3 (cepa 686); línea 5, *B. suis* biovar 4 (cepa 40); línea 6, *B. suis* biovar 5 (cepa 513).

En la figura 13 se presenta un ejemplo de los resultados de identificación de los aislamientos realizados como *B. suis* biovar 2 en la técnica “Suis-ladder”.

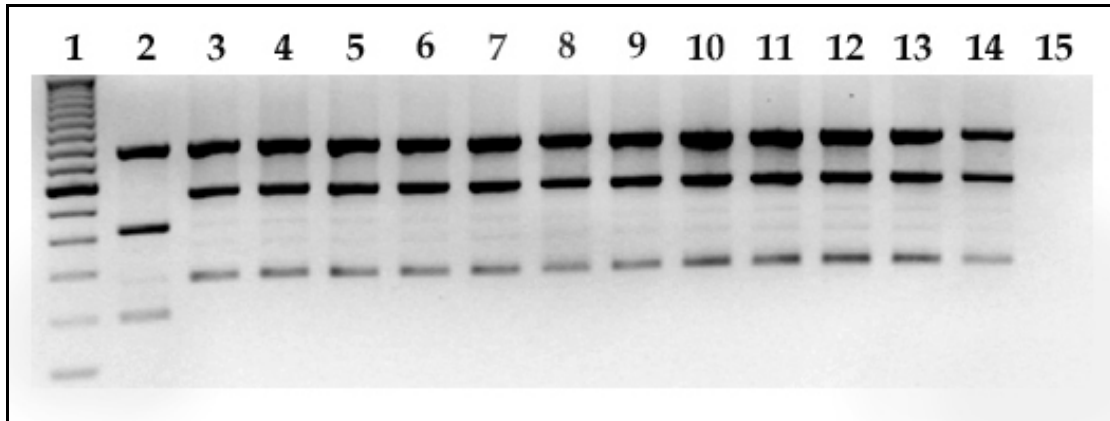


Figura 13: PCR multiplex "Suis ladder". Línea 1, marcador de pesos moleculares de 100pb (Invitrogen Ltd.); línea 2, *B. suis* biovar 1 (cepa de referencia 1330, usada como control); línea 3, *B. suis* biovar 2 (cepa de referencia Thomsen, usada como control); líneas 4 a 14, cepas de campo representativas aisladas de jabalíes de nuestro estudio, e identificadas en todos los casos como *B. suis* biovar 2; línea 15, control negativo (H₂O).

Una vez identificadas todas las cepas de *B. suis* aisladas en jabalíes como pertenecientes a la biovar 2, se procedió a caracterizar el correspondiente haplotipo mediante PCR-RFLP de los genes de proteínas de membrana externa *Omp2a*, *Omp2b* y *Omp31* (ver capítulo 3.2.2.2. material y métodos). Los patrones de restricción utilizados para la diferenciación de los principales haplotipos de *B. suis* biovar 2 se esquematizan en la figura 14.

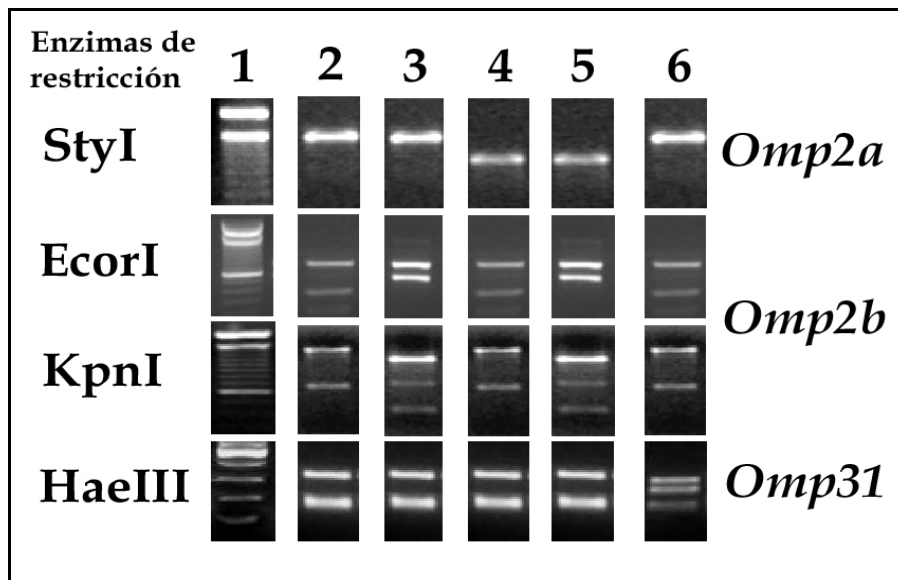


Figura 14: Patrones de restricción identificados para las cepas de *B. suis* biovar 2 tras amplificación mediante PCR de los genes de proteínas de la membrana externa (*Omp2a*, *Omp2b* y *Omp31*) y posterior digestión de los mismos con la enzimas de restricción indicadas (PCR-RFLP). Línea 1, marcador de pesos moleculares de 100 pb (Invitrogen Ltd.); línea 2, patrón característico de la cepa *B. suis* biovar 2 de referencia (Thomsen), aislado en jabalíes, liebres europeas y cerdos domésticos en varios países europeos, pero nunca aislado en

España; línea 3, patrón característico del haplotipo centroeuropeo de *B. suis* biovar 2, aislado en jabalíes y cerdos domésticos en varios países de Europa, incluyendo España (este haplotipo también se ha encontrado en liebres europeas en algunos países europeos, pero nunca en liebres españolas); línea 4, patrón característico del haplotipo ibérico mayoritario de *B. suis* biovar 2, aislado exclusivamente de jabalíes y cerdos domésticos en la península ibérica, y nunca aislado en los restantes países europeos; línea 5, patrón característico del haplotipo ibérico minoritario de *B. suis* biovar 2, aislado también exclusivamente en jabalíes y cerdos de la península ibérica, y nunca aislado en los restantes países europeos. Línea 6, patrón identificado exclusivamente en cepas aisladas de liebre europea del noreste de España y sur de Francia.

De las 107 cepas de *B. suis* biovar 2 aisladas a lo largo del periodo de estudio, un total de 90 mostraron patrones de restricción idénticos a los del haplotipo centroeuropeo (aislado en todos los países europeos), mientras que tan solo 17 presentaron patrones idénticos a los del haplotipo ibérico mayoritario (aislado exclusivamente en la península ibérica). Ningún otro de los haplotipos descritos hasta ahora para la biovariedad 2 de *B. suis* fue identificado en nuestro estudio.

Los haplotipos de *B. suis* biovar 2 aislados en función de la temporada de caza de los jabalíes estudiados se presentan en la tabla 18.

Temporada	Haplotipos		
	Centroeuropeo	Ibérico mayoritario	Total
1º Temporada 2008-2009	12	1	13
2º Temporada 2009-2010	41	11	52
3º Temporada 2010-2011	20	3	23
4º Temporada 2011-2012	17	2	19
Total	90	17	107

Tabla 18: Distribución de los haplotipos de *B. suis* biovar 2 en función de la temporada de caza.

Como puede apreciarse, no se apreciaron diferencias significativas ($p=0,721$) en la frecuencia de aislamientos de los correspondientes haplotipos en función de las diferentes temporadas de caza, si bien el haplotipo centroeuropeo se aisló siempre de manera mayoritaria.

Sexo	Haplotipos		
	Centroeuropeo	Ibérico mayoritario	Total
Macho	49	7	56
Hembra	28	7	35
Total	77	14	91

Tabla 19: Distribución de los haplotipos de *B. suis* biovar 2 en función del sexo de los jabalíes estudiados.

Con respecto a las diferencias en función del sexo (tabla 19), el haplotipo centroeuropeo se aisló más frecuentemente en machos que en hembras, mientras que no hubo diferencias en el caso del otro haplotipo identificado ($p=0,335$).

La distribución de los aislamientos de *B. suis* biovar 2 en función del haplotipo y la edad de los animales analizados se muestra en la tabla 20.

Edad	Haplotipos		
	Centroeuropo	Ibérico mayoritario	Total
Adulto	53	13	66
Joven	16	1	17
Jabato	0	0	0
Total	69	14	83

Tabla 20: Distribución de los haplotipos de *B. suis* biovar 2 en función de la edad de los jabalíes.

No hubo ningún aislamiento en jabatos y, en sincronía con los resultados microbiológicos generales, la frecuencia de aislamiento de cada haplotipo fue mayor en los animales adultos que en las otras clases de edad.

La distribución de ambos haplotipos en las diferentes comarcas aragonesas muestreadas se presenta en la figura 15.

Como puede apreciarse, el haplotipo centroeuropeo se aisló en todas las comarcas en las que hubo aislamiento de *B. suis*, mientras que la presencia del haplotipo ibérico mayoritario quedó circunscrita a tan solo 7 comarcas, en las que, además, hubo siempre una co-existencia de los dos haplotipos. Estas 7 comarcas fueron: Aranda, Campo de Borja, Cinco Villas, D.C. Zaragoza, Hoya de Huesca, Los Monegros y Tarazona y el Moncayo.

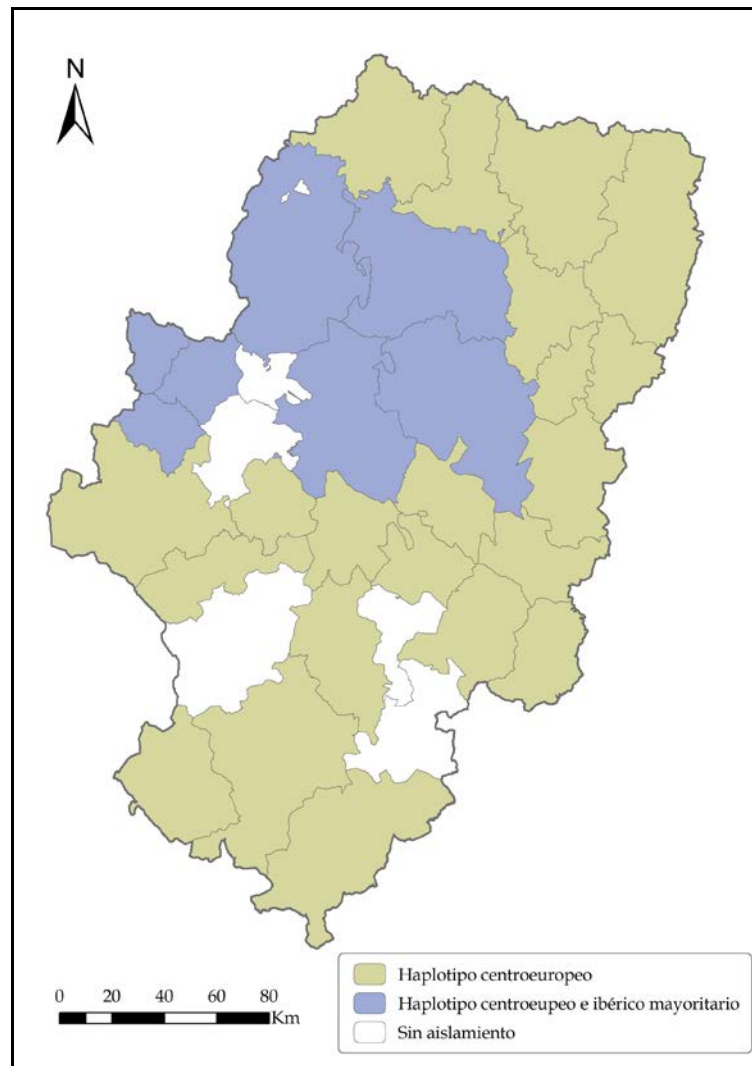


Figura 15: Distribución de los haplotipos ibérico mayoritario y centroeuropeo en las comarcas de Aragón.

4.1.3.- RESULTADOS ANATOMOPATOLÓGICOS DE BRUCELOSIS EN EL JABALÍ

Un total de 366 bazos fueron inspeccionados macroscópicamente durante la toma de muestras realizada en el campo. En ninguno de los bazos examinados se observaron lesiones macroscópicas. Por otra parte, en ninguno de los 21 úteros inspeccionados también macroscópicamente (algunos grávidos con fetos en su interior) se observaron lesiones apreciables, con la excepción de una hembra adulta (S-1515/10), cuyo útero presentó una gran cantidad de exudado mucoso de aspecto sucio y lechoso. Dicho animal resultó negativo en serología frente a brucelosis y, además, todas sus muestras de necropsia resultaron negativas tras su estudio bacteriológico.

Finalmente, 126 testículos y epidídimos fueron inspeccionados macroscópicamente mediante palpación y exploración visual en busca de abscesos, nódulos, lesiones inflamatorias o purulentas y focos de calcificación o necrosis. En ninguno de ellos se observaron lesiones macroscópicas, excepto en un macho adulto de jabalí (S-2302/09), cuya vaginal externa estaba engrosada y presentaba estrías de coloración amarillenta así como algunas adherencias focales entre la vaginal y el epidídimo. El testículo tenía un aspecto normal, pero la cabeza del epidídimo estaba ligeramente aumentada de tamaño y su consistencia era dura. A la sección el epidídimo tenía aspecto fibroso y presentaba pequeños focos necróticos (figura 16). Al presentar lesiones macroscópicas, se procedió a realizar el cultivo de todas las muestras disponibles, es decir, testículo, epidídimo, linfonodos mandibulares y linfonodos escrotales. Para el estudio histopatológico se tomaron muestras de epidídimo, testículo y túnica vaginal.

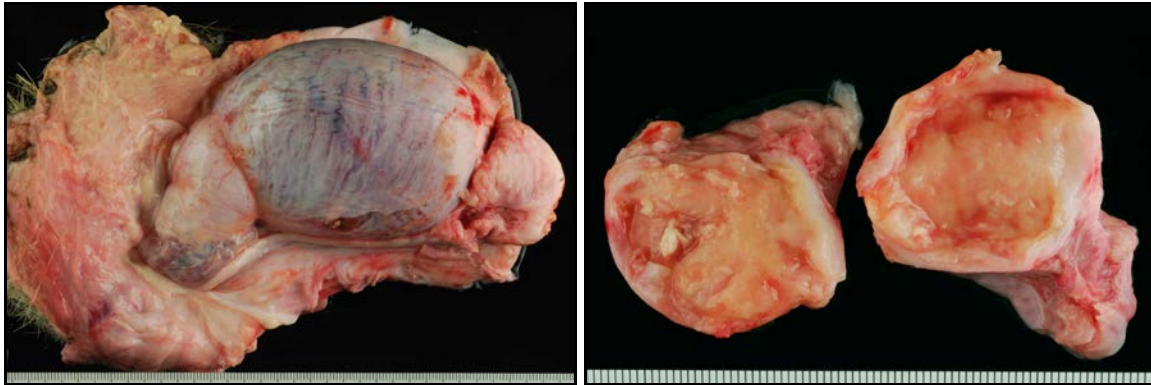


Figura 16: Testículo y epidídimo del único jabalí en el que se evidenciaron alteraciones macroscópicas en el momento de la toma de muestras, y que resultó infectado por *B. suis* biovar 2.

El estudio microscópico confirmó la ausencia de lesiones en testículo, sin embargo el epidídimo presentaba una vaginalitis crónica difusa, hiperplasia epitelial y varios granulomas espermáticos. Los cortes histológicos sometidos a la técnica de IHQ, dieron reacción positiva, identificándose las bacterias en el interior de células fagocíticas presentes en la lesión granulomatosa (figura 17).

La serología de este animal resultó positiva y el cultivo permitió aislar *B. suis* biovar 2 de testículo, epidídimo, linfonodos mandibulares y linfonodos escrotales. La cepa aislada en este caso presentó un patrón idéntico al haplotipo centroeuropeo.

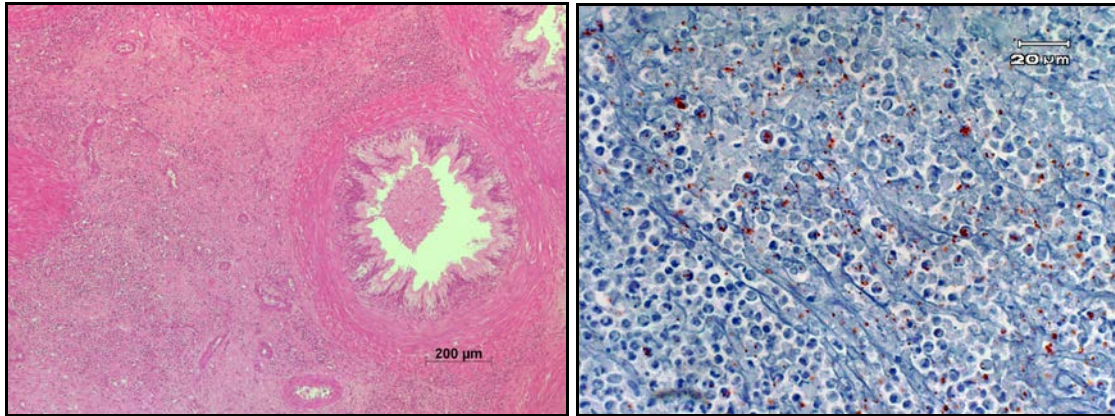


Figura 17: Histología (H-E) e IHQ del epidídimo.

En los 13 animales encontrados muertos realizamos su necropsia sistemática. En la tabla 21 se resumen los datos de estos animales, los resultados de serología y cultivo y la causa de la muerte.

Ref	Edad	Sexo	Comarca	Diagnostico	iELISA	Cultivo
S-7/09	Joven	♂	La Jacetania	Neumonía verminosa	Negativo	Negativo
S-8/09	Joven	♀	La Jacetania	Neumonía verminosa	Negativo	Negativo
S-78/09	Joven	♀	La Jacetania	Neumonía verminosa	Negativo	Negativo
S-127/09	Jabato	♀	La Jacetania	Neumonía verminosa	Negativo	Negativo
S-280/09	Joven	♂	La Jacetania	Trauma	Negativo	Negativo
S-1516/09	Adulto	♂	Los Monegros	Trauma	Positivo	Positivo
S-1768/09	Joven	♂	Matarraña	Trauma	Positivo	Positivo
S-46/10	Joven	♂	Matarraña	Trauma	Negativo	Negativo
S-706/10	Adulto	♀	D.C. Zaragoza	Trauma (disparo)	Positivo	Positivo
S-1345/10	Joven	♂	D.C. Zaragoza	Trauma (disparo)	Negativo	Negativo
S-347/11	Joven	♂	Matarraña	Trauma	Positivo	Negativo
S-40/12	Adulto	♂	D.C. Zaragoza	Trauma	Negativo	Negativo
S-105/12	Adulto	♂	Sierra de Albarracín	Trauma (disparo)	Negativo	Negativo

Tabla 21: Resultados obtenidos en los jabalíes encontrados muertos.

En ninguno de estos animales se apreciaron alteraciones articulares o malos aplomos y en todos los casos se concluyó que las muertes fueron de origen traumático y por neumonía verminosa. Sin embargo, en la necropsia de un macho adulto (S-1516/09) encontrado muerto en la comarca de Los Monegros, se puso en evidencia una lesión macroscópica en un epidídimo. Este animal fue atropellado y presentaba múltiples hematomas con rotura del diafragma y paso de vísceras abdominales a la cavidad torácica. A la palpación el epidídimo presentaba macroscópicamente una zona aumentada de tamaño y dura a la palpación localizada en cabeza, que a la sección tenía aspecto fibroso y en su interior había una pequeña cantidad de pus. También se identificaron algunas calcificaciones de pequeño tamaño (figura 18). Se procedió directamente a realizar el cultivo de esta lesión así como del resto de órganos disponibles de este jabalí. De la lesión epididimaria se aisló *B. suis* biovar 2, sin embargo, el cultivo

del resto de tejidos dio resultado negativo. El patrón identificado para esta cepa se correspondió con el haplotipo ibérico mayoritario. También se recogió suero para realizar el consiguiente estudio serológico que resultó positivo frente a brucelosis.

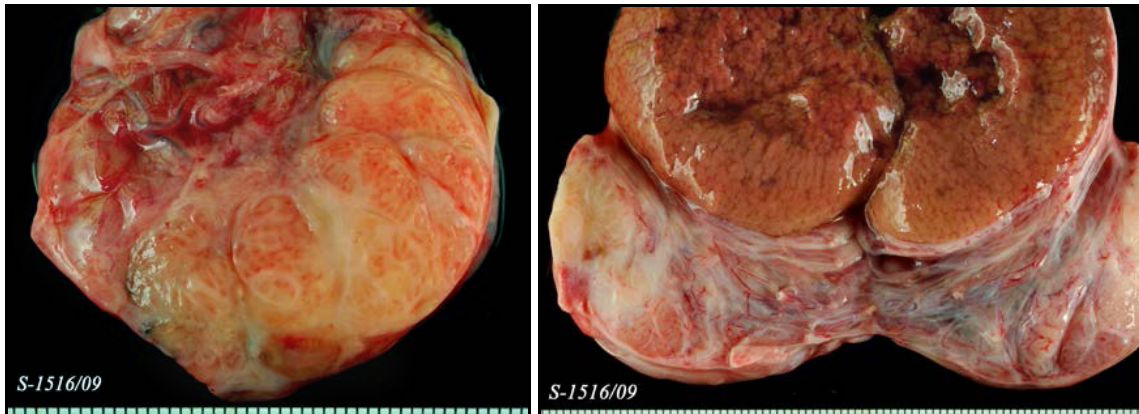


Figura 18: Epidídimo de un jabalí infectado por *B. suis* biovar 2, presentando zonas aclaradas, fibrosadas y pus.

En el estudio histológico se observaron pequeñas zonas de mineralización y focos de necrosis acompañado de una hiperplasia epitelial y escasos granulomas espermáticos. Así mismo se realizó IHQ, resultando claramente positiva.

4.2- RESULTADOS EN LAS LIEBRES

4.2.1.- RESULTADOS SEROLÓGICOS

Las condiciones óptimas del iELISA desarrollado para el diagnóstico de la brucelosis en esta especie, se determinaron mediante una serie de ensayos con distintas concentraciones de antígeno y suero, diferentes conjugados y tiempos de lectura (ver capítulo 3.3.2.1. material y métodos). Con las diferentes concentraciones usadas del conjugado policlonal anti-IgG de conejo, ninguno de los 20 sueros controles positivos de liebres hiperinmunizadas fue detectado como positivo, por lo que concluimos que este reactivo heterólogo no era capaz de detectar inmunoglobulinas de liebre y fue definitivamente descartado. Sin embargo, las 3 proteínas recombinantes probadas como conjugado (Proteína A, Proteína G y Proteína AG) fueron capaces de unirse a las inmunoglobulinas de liebre, a una concentración óptima de entre 0,2 $\mu\text{g/ml}$ y 0,3 $\mu\text{g/ml}$, dando buenos resultados para diferenciar los sueros positivos de los negativos tras 15 minutos de incubación. Los resultados de las medias de densidad óptica (DO) obtenidas

con diferentes diluciones de los sueros positivos y negativos usados como control (ver capítulo 3.3.2.1. material y métodos), se presentan en la figura 19.

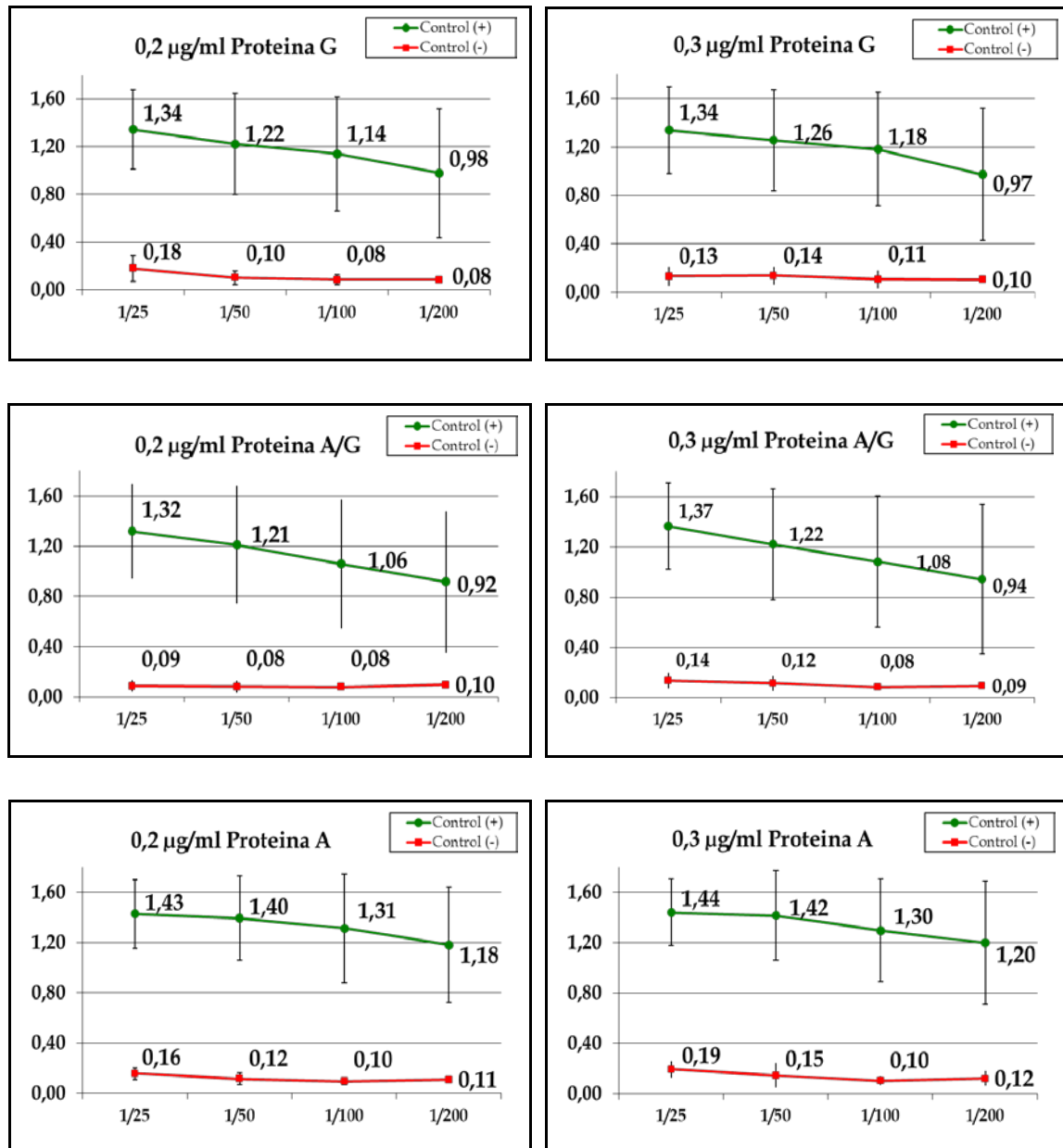


Figura 19: Media y desviación estándar (barras perpendiculares) de las densidades ópticas (DO) obtenidas en el iELISA con diferentes concentraciones de las 3 proteínas recombinantes (proteína G: panel superior; proteína AG: panel central; proteína A: panel inferior) ensayadas como conjugado, y diferentes diluciones de los sueros positivos ($n=20$) y negativos ($n=11$).

Como puede apreciarse, la mayor diferencia entre la media de densidad óptica (DO) de los sueros positivos y negativos se obtuvo con la dilución 1/50 de suero, que fue considerada como la dilución óptima de suero para el posterior estudio de determinación de la seroprevalencia en muestras de campo. De entre las tres proteínas

recombinantes evaluadas como conjugado, la proteína A (a razón de 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) fue la que, merced a la menor desviación estándar obtenida en las medias de DO, proporcionó las mayores diferencias entre los sueros positivos y negativos, por lo que fue seleccionada como conjugado para el estudio definitivo. Para la determinación del punto de corte a usar en dicho estudio definitivo de determinación de la seroprevalencia, se llevó a cabo un ensayo utilizando las concentraciones y reactivos óptimos, pero analizando por duplicado 10 sueros obtenidos tras la primera ($n=5$) y segunda ($n=5$) inmunización de las liebres (que fueron considerados como población positiva), haciendo un total de 20 sueros y los 11 sueros de las liebres no inmunizadas usadas como control negativo ($n=6$), tomados al final del ensayo, mas los sueros obtenidos antes de la inoculación de las liebres hiperinmunizadas ($n=5$). Todas estas liebres las consideramos como población negativa. Como control positivo de placa se utilizó uno de los 20 sueros anteriormente testados, que presentaba el valor de DO más cercano al valor promedio. Se determinó como punto de corte el 40% de DO (ver capítulo 3.3.2.1. material y métodos), ya que permitía un 100% de especificidad y sensibilidad diagnóstica con las poblaciones de sueros utilizada como control positivo y negativo (figura 20).

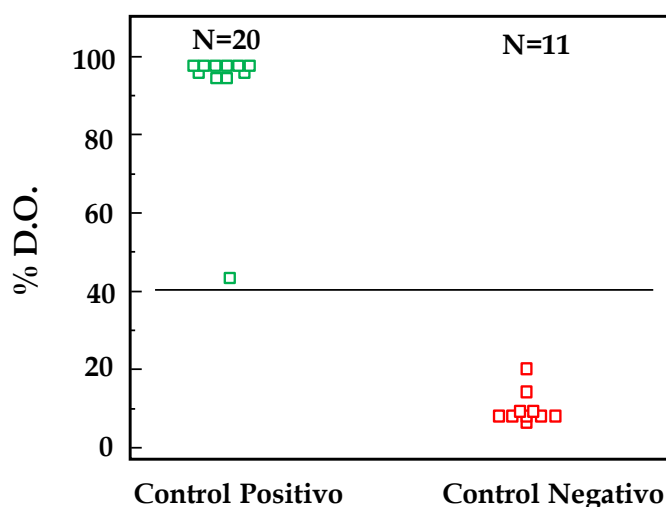


Figura 20: Distribución de las medias de densidad óptica (DO) de los sueros de las liebres usadas como control positivo ($n=20$) y control negativo ($n=11$), y analizadas mediante el iELISA en las condiciones óptimas (dilución de suero al 1/50 y proteína A -0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ - como conjugado). La barra horizontal representa el punto de corte (40% de DO con respecto al suero control) seleccionado para el estudio definitivo de determinación de la seroprevalencia en muestras de campo.

Una vez determinadas las condiciones óptimas del iELISA, se analizaron por duplicado todos los sueros de liebre recogidos (ver 3.3.2.1. material y métodos). La distribución de los valores medios de DO de los sueros de las poblaciones de liebre

ibérica y europea analizadas se presenta en la figura 21. Como puede apreciarse, no hubo diferencias en los valores de DO entre los sueros de ambas poblaciones de liebre analizadas. Dichos valores se encontraron siempre por debajo del punto de corte seleccionado, y fueron coincidentes con los valores de DO obtenidos con los sueros de las liebres europeas usados como control negativo (figura 20). En consecuencia, estos resultados demuestran la inexistencia de brucelosis en ambas poblaciones de liebre en Aragón.

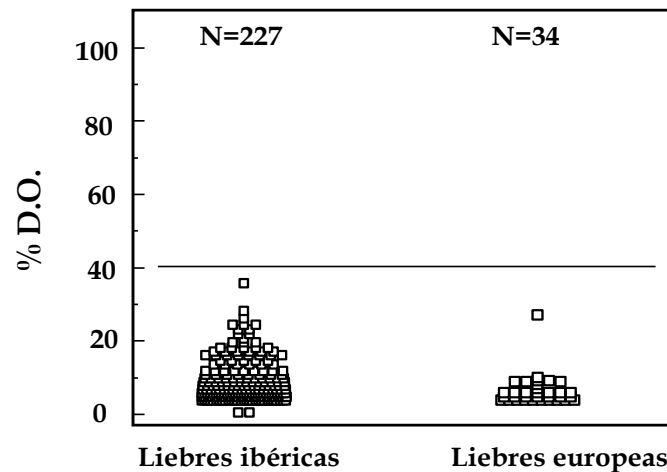


Figura 21: Distribución de las medias de densidad óptica (DO) de los sueros de la totalidad de liebres analizadas mediante el iELISA en Aragón. La barra horizontal representa el punto de corte a partir del que los valores de DO se consideran positivos.

4.2.2.- RESULTADOS BACTERIOLÓGICOS

Pese a no encontrar ningún animal seropositivo en el iELISA, y con la finalidad de confirmar la adecuada especificidad de nuestros resultados serológicos, tomamos la decisión de estudiar bacteriológicamente la totalidad de las liebres europeas cazadas y encontradas muertas, así como de todas las liebres ibéricas cazadas en comarcas en las que identificamos mayor seroprevalencia de brucelosis en el jabalí. Además, se realizaron cultivos bacteriológicos a todas las muestras de liebres europeas obtenidas con anterioridad al periodo de estudio, y conservadas en la FVUZ.

Todos los cultivos realizados tanto de liebres europeas como de liebres ibéricas resultaron negativos, demostrándose así la adecuada especificidad diagnóstica de nuestros resultados serológicos, y la inexistencia de brucelosis en las liebres de Aragón.

4.2.3.- RESULTADOS ANATOMOPATOLÓGICOS

Un total de 107 vísceras de liebres fueron inspeccionadas macroscópicamente durante la recepción de muestras de animales cazados durante el periodo de estudio. Además se realizó la necropsia de 21 animales encontrados muertos. Ninguna de las vísceras examinadas macroscópicamente presentó lesiones compatibles con brucelosis.

4.3- RESULTADOS EN LOS PERROS DE CAZA

4.3.1.- RESULTADOS SEROLÓGICOS

De los 575 sueros de perros de caza analizados mediante la técnica de rosa de Bengala modificado (RBTm), un total de 43 fueron positivos, resultando en una seroprevalencia del 7,48% (IC 95%: 5,60-9,92). Por otra parte, 16 de estos 43 sueros resultaron positivos también en la prueba de rosa de Bengala estándar (RBTest), obteniéndose en consecuencia una seroprevalencia de brucelosis del 2,78% (IC 95%: 1,72-4,47) con esta interpretación. En la tabla 22 se presenta la distribución de los sueros positivos por comarcas y por técnica empleada.

Comarcas	Nº Perros	Nº positivos RBTm	Nº positivos RBTest
Alto Gállego	5	0	0
Andorra-Sierra de Arcos	16	2	0
Bajo Aragón	32	1	0
Bajo Aragón-Caspe	39	2	0
Bajo Cinca	40	3	2
Bajo Martín	8	0	0
Campo de Borja	34	2	1
Campo de Cariñena	24	1	0
Comunidad de Calatayud	38	1	0
Comunidad de Teruel	19	1	0
Cuencas Mineras	40	0	0
D.C. Zaragoza	40	3	2
Gúdar-Javalambre	18	2	0
Jiloca	38	4	1
La Jacetania	22	1	1
La Ribagorza	48	5	3
Los Monegros	19	1	1
Maestrazgo	2	0	0
Matarraña	11	0	0
Ribera Baja del Ebro	20	3	1
Sierra de Albarracín	21	3	2
Sobrarbe	20	3	0
Tarazona y el Moncayo	21	5	2
Total	575	43	16

Tabla 22: Distribución de los perros seropositivos en la prueba de rosa de Bengala modificada (RBTm) y estándar (RBTest) en las diferentes comarcas en las que se pudo obtener muestras.

En aquellas comarcas con altas frecuencias de aislamiento de *B. suis* biovar 2 en jabalí como La Ribagorza o Tarazona y el Moncayo, fue en las que obtuvimos el mayor número de perros seropositivos en la técnica de RBTm. En general, en 18 de las 23 comarcas analizadas se detectaron perros seropositivos, y en las 5 restantes no dispusimos de un número adecuado de perros.

En todas las comarcas en las que detectamos perros seropositivos se logró aislar *B. suis* biovar 2 en el jabalí, con la excepción de las comarcas de Andorra-Sierra de Arcos y Jiloca, en las que no hubo aislamiento.

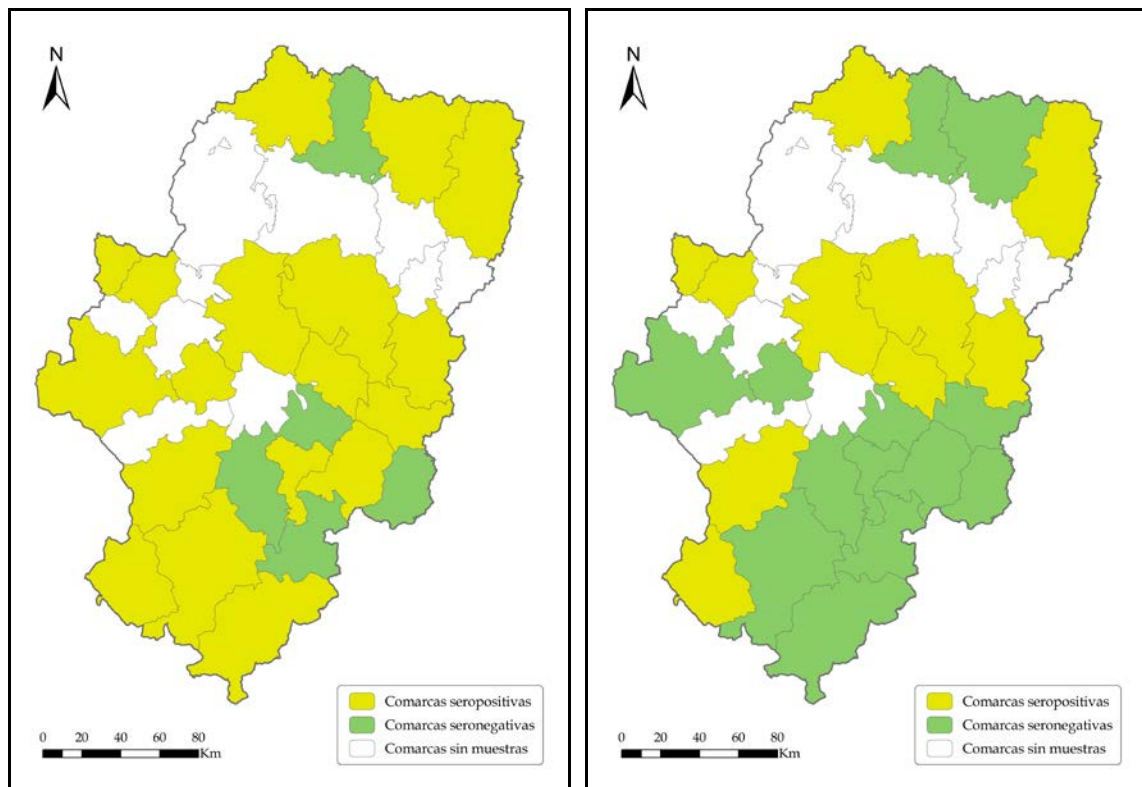


Figura 22: Distribución comarcal de los perros seropositivos en la prueba de rosa de Bengala modificada (mapa de la izquierda) y prueba de rosa de Bengala estándar (mapa de la derecha), en las diferentes comarcas en las que se pudo obtener muestras.

En la figura 22 se presenta la distribución espacial de las comarcas seropositivas y seronegativas respecto a la técnica aplicada, mostrando 5 comarcas que fueron seronegativas en ambas técnicas. Tampoco se aprecia ningún patrón de distribución reseñable.

En la tabla 23 se presenta el número de perros seropositivos en ambas técnicas en función del sexo y edad. Los resultados se muestran estratificados por sexo y edad, en aquellos perros en los que ambos parámetros pudieron ser determinados.

Edad	Sexo								
	Macho			Hembra			Total		
	Nº	Nº positivo RBTm	Nº positivo RBTest	Nº	Nº positivo RBTm	Nº positivo RBT	Nº	Nº positivo RBTm	Nº positivo RBT
Viejo	19	3	0	6	0	0	25	3	0
Adulto	279	16	8	153	9	3	432	25	11
Joven	37	4	2	17	4	1	54	8	3
Total	335	23	10	176	13	4	511	36	14

Tabla 23: Resultados obtenidos en las pruebas de rosa de Bengala estándar (RBTest) y modificada (RBTm), en función del sexo y edad de los perros.

Como puede apreciarse, el mayor número de perros seropositivos correspondió al grupo de adultos, siendo este grupo el más numeroso. También hubo un mayor número de machos seropositivos que de hembras. Todos los perros seropositivos participaban activamente de la caza del jabalí, excepto dos perros jóvenes (S-759/09; S-1061/09), que todavía no habían salido a cazar, ni habían comido carne ni vísceras de jabalí.

Ninguna rehala visitada señaló haber tenido problemas de abortos ni de infertilidad y tampoco los perros convivían con ganado domestico de ningún tipo. Todas las rehalas realizaban una limpieza y desinfección de las instalaciones y disponían de asistencia veterinaria.

De las 37 rehalas visitadas, en 13 no alimentaban a los perros con carne o vísceras de jabalí, mientras que en 24 alimentaban frecuentemente a los perros con carne, vísceras o jabalíes enteros. En la tabla 24 se presentan los resultados serológicos en función del tipo de alimentación. La mayoría de perros seropositivos, 26 en la técnica RBTm y 10 en la de RBTest, se ubicaron en las rehalas que alimentaban a sus perros con carne o vísceras de jabalí. El resto de perros seropositivos se correspondió con rehalas que realizaban una alimentación convencional.

	Alimentación con carne o vísceras de Jabalí		Alimentación convencional	
	+	-	+	-
RBTm	26	325	17	207
RBTest	10	341	6	218

Tabla 24: Resultados obtenidos en las pruebas de rosa de Bengala estándar (RBTest) y modificada (RBTm), en función del tipo de alimentación de los perros.

En las tablas 25 se describen las características más relevantes de los perros seropositivos en la técnica de RBTest.

Ref	Edad	Sexo	Comarca	RBTest	Diluciones límite de positividad en RBTest	Caza
S-759/09	Joven	♂	Campo de Borja	Positivo	negativo a 1/2	Sin cazar
S-1061/09	Joven	♀	La Jacetania	Positivo	negativo a 1/4	Sin cazar
S-1083/09	Adulto	♀	Bajo Cinca	Positivo	negativo a 1/2	Jabalí/Ciervo
S-1095/09	Adulto	♂	Bajo Cinca	Positivo	negativo a 1/4	Jabalí/Ciervo
S-1117/09	Adulto	♀	Tarazona y el Moncayo	Positivo	negativo a 1/4	Jabalí
S-1122/09	Adulto	Ind.	Tarazona y el Moncayo	Positivo	negativo a 1/4	Jabalí
S-1180/09	Adulto	♂	La Ribagorza	Positivo	negativo a 1/4	Jabalí
S-1234/09	Adulto	♂	Jiloca	Positivo	negativo a 1/4	Jabalí/Ciervo
S-1260/09	Adulto	♂	Sierra de Albarracín	Positivo	negativo a 1/4	Jabalí/Ciervo
S-1264/09	Adulto	♂	Sierra de Albarracín	Positivo	negativo a 1/128	Jabalí/Ciervo
S-1633/09	Adulto	♀	Los Monegros	Positivo	negativo a 1/16	Jabalí
S-1823/09	--	♂	D.C. Zaragoza	Positivo	negativo a 1/4	Jabalí
S-124/10	Adulto	♂	La Ribagorza	Positivo	negativo a 1/4	Jabalí
S-125/10	Adulto	♂	La Ribagorza	Positivo	negativo a 1/4	Jabalí
S-1451/10	Joven	♂	D.C. Zaragoza	Positivo	negativo a 1/2	Jabalí
S-735/11	Adulto	♂	Ribera Baja del Ebro	Positivo	negativo a 1/4	Jabalí

Tabla 25: Características más relevantes de los perros que fueron encontrados positivos en la prueba de rosa de Bengala estándar (RBTest).

Ninguno de los perros sometidos a estudio serológico presentó signos clínicos compatibles con brucelosis.

4.3.2.- RESULTADOS BACTERIOLÓGICOS

En los perros seropositivos que presentaban positividad a diluciones altas y siempre que se pudo contar con la colaboración del propietario, se realizó una extracción de sangre entera del animal afectado para realizar el hemocultivo. Tan solo pudieron realizarse hemocultivos de 4 perros, 2 de la comarca de Albarracín de la misma rehala, 1 perro de la comarca de Zaragoza y otro de la comarca La Ribera Baja del Ebro. Los cuatro animales se confirmaron de nuevo como seropositivos en la técnica de RBTest, pero resultaron negativos en el hemocultivo.

En la tabla 26 se presentan las características más relevantes de los perros sometidos a hemocultivo.

Ref	Edad	Sexo	Comarca	Diluciones límite de positividad en RBTest	Hemocultivo
S-1260/09	Adulto	♂	Sierra de Albarracín	negativo a 1/4	Negativo
S-1264/09	Adulto	♂	Sierra de Albarracín	negativo a 1/128	Negativo
S-1451/10	Joven	♂	D.C. Zaragoza	negativo a 1/2	Negativo
S-735/11	Adulto	♂	Ribera Baja del Ebro	negativo a 1/4	Negativo

Tabla 26: Características más relevantes de los perros sometidos a hemocultivo.

DISCUSIÓN

5.- DISCUSIÓN

Pese a la escasez o ausencia de estudios al respecto, la fauna silvestre es considerada por muchos como un reservorio potencial de brucelosis para los animales domésticos y para el hombre. Con el objetivo de clarificar si la fauna silvestre en Aragón representa o puede representar un peligro potencial de transmisión de enfermedades a los animales domésticos y al hombre, nuestro Departamento de la FVUZ viene trabajando desde hace años en la elaboración de estudios epidemiológicos en la fauna silvestre, realizando un seguimiento sanitario de la misma. En el presente trabajo hemos pretendido determinar la seroprevalencia de la infección de brucelosis en jabalíes, liebres y perros de caza de la Comunidad Autónoma de Aragón. Nuestros resultados se han obtenido mediante una búsqueda activa a través del estudio de los animales cazados y, en menor medida, también de una forma pasiva, estudiando aquellos animales encontrados muertos en la naturaleza. Todo ello ha sido posible merced a la buena disposición que hemos encontrado en los Agentes de Protección de la Naturaleza, titulares de los cotos y cazadores, tanto en la recogida de muestras como en la toma de las mismas. Esta desinteresada colaboración de todos estos actores ha hecho posible que el número de jabalíes, liebres y perros a los que hemos podido acceder ha sido muy considerable. Sin embargo, somos conscientes también que alguno de nuestros resultados habrá sido seguramente subestimado o sobrestimado, particularmente en aquellas comarcas y especies animales en las que no ha sido posible obtener un número suficientemente representativo de muestras. Una de las principales dificultades para realizar estudios de detección de enfermedades en las especies silvestres reside precisamente en la obtención de muestras. En el caso de especies cinegéticas, la obtención de muestras se realiza habitualmente de manera activa en animales cazados, ya que recurrir a la búsqueda pasiva en los animales encontrados muertos o enfermos en el medio natural es mucho más dificultoso y lento, además, puede resultar en sesgos importantes (McAloose & Newton, 2009; Mörner *et al.*, 2002). En algunos trabajos recientes de nuestro grupo y relativos también a la detección de enfermedades en especies cinegéticas de nuestra región, el número de animales muertos o enfermos a los que se tuvo acceso fue mucho mayor que en nuestro caso, debido posiblemente al mayor valor económico de las especies estudiadas y a la mayor vigilancia cinegética y sanitaria existente en dichas especies (Arnal, 2011; Revilla, 2012).

Aragón es un vasto territorio compuesto por 33 comarcas y uno de los planteamientos esenciales de nuestra tesis consistió en intentar obtener un número significativo de muestras en todas las comarcas para obtener resultados suficientemente representativos. Lamentablemente, este planteamiento no pudo ser cumplido totalmente, y en algunas comarcas no logramos obtener las muestras adecuadas. Esto fue debido esencialmente a la dificultad en la coordinación con los cazadores y a la escasa dimensión de nuestro equipo, que unido a las dificultades orográficas del territorio en estudio, imposibilitaban nuestra presencia en varios lugares simultáneamente mientras se realizan las batidas. Además, otro factor importante fue la escasa actividad cinegética en algunas comarcas, en las que pese a haber realizado numerosas visitas, no logramos obtener un número representativo de muestras. Es importante tener en consideración que a diferencia de otros estudios similares al nuestro (Bergagna *et al.*, 2009; Closa-Sebastià *et al.*, 2010; Grégoire *et al.*, 2012; Risco *et al.*, 2013; Vicente *et al.*, 2002), la totalidad de muestras analizadas han procedido de animales de vida libre que han sido cazados o encontrados muertos en la naturaleza, y en ningún caso de animales situados en cercados o vallados cinegéticos, en los que la intervención humana puede condicionar en gran medida la prevalencia de las enfermedades (Gortázar *et al.*, 2006).

5.1.- ESTUDIOS EN EL JABALÍ

La población de jabalí se distribuye de manera uniforme por toda la región aragonesa, y su abundancia es importante, aunque no homogénea (Gortázar *et al.*, 2000; Osuna *et al.*, 2006), siendo la especie cinegética de caza mayor más importante de Aragón (Herrero, 2002). En consecuencia, el número de muestras obtenido durante el periodo de estudio ha sido muy considerable (tabla 1) y creemos que suficiente para poder extraer conclusiones muy sólidas sobre la situación de la brucelosis en esta especie en Aragón. Pese a ello, en varias comarcas sólo pudimos tomar un número muy limitado de muestras y, en algún caso (Ribera Alta del Ebro), no fuimos capaces de obtener muestras.

La determinación de la seroprevalencia de brucelosis en el jabalí se ha realizado clásicamente mediante obtención de suero sanguíneo y su análisis mediante pruebas serológicas convencionales como la aglutinación rápida con antígeno rosa de Bengala (RBT), la fijación del complemento (CFT) y la seroaglutinación lenta en tubo -SAT- (Becker *et al.*, 1978; Bergagna *et al.*, 2009; Drew *et al.*, 1992; Grégoire *et al.*, 2012; Hubálek

et al., 1993; Ruiz-Fons *et al.*, 2006; van der Leek *et al.*, 1993; Zygmunt *et al.*, 1982). Sin embargo, estas pruebas de diagnóstico indirecto presentan inconvenientes muy importantes, que limitan considerablemente el valor de los estudios mencionados. En el caso concreto de la prueba de CFT existe una ausencia total de información sobre la temperatura idónea para la inactivación del complemento de jabalí, se desconoce la capacidad de sus inmunoglobulinas para fijar complemento de cobayo, y sobre todo, no existen estudios para la selección de un título (punto de corte) adecuado, a partir del cual considerar esta prueba como positiva en esta especie silvestre. Además, ha sido demostrado que la prueba de CFT posee una sensibilidad muy baja para el diagnóstico de la brucelosis porcina (Muñoz *et al.*, 2012), la especie doméstica más relacionada filogenéticamente con el jabalí. Finalmente, para la realización de esta prueba es imprescindible que las muestras de suero estén libres de hemólisis, algo prácticamente imposible de lograr en los estudios de campo como el nuestro. Por todas estas razones, esta prueba fue completamente descartada para ser usada en nuestro estudio.

Las técnicas de aglutinación (y en particular la de RBT) son consideradas las pruebas de elección para la determinación de anticuerpos frente a infecciones por brucelas en fase lisa en la práctica totalidad de especies de mamíferos incluyendo el jabalí (Garin-Bastuji & Blasco, 1997). Sin embargo, para que esta prueba (RBT) pueda aplicarse, es imprescindible trabajar con muestras de suero de calidad y, sobre todo, desprovistas de hemólisis. En estudios en fauna silvestre como el realizado por nosotros, la hemólisis y contaminación de las muestras de suero son un problema generalizado, derivado de la enorme dificultad para obtener las muestras frescas y de las propias condiciones de obtención y transporte. La hemólisis del suero supone un problema muy relevante a la hora de interpretar la aglutinación mediante la RBT, ya que puede ocasionar excesivos resultados falsos positivos, y en muchos casos, los resultados son imposibles de interpretar correctamente (Muñoz *et al.*, 2010), lo que reduce muy significativamente el número de muestras que pueden ser estudiadas mediante esta técnica. Por todas estas razones decidimos también descartar el uso de las pruebas de aglutinación (RBT y SAT) para la determinación de la seroprevalencia de brucelosis en nuestro estudio. Por el contrario, la gran ventaja de los inmuno-enzimoensayos (ELISA) es que permiten analizar sueros de baja calidad y con niveles elevados de hemólisis, incluso sangre completa (Neumann & Bonistalli, 2009), asimismo, utilizan muy poca cantidad de suero, que puede quedar disponible para posteriores estudios retrospectivos de otros agentes

patógenos, aspecto de gran importancia práctica en nuestras condiciones. Por esta razón, decidimos basar nuestra investigación en esta prueba diagnóstica.

La mayoría de estudios publicados para la determinación de la seroprevalencia de brucelosis en el jabalí han utilizado una combinación de varias pruebas serológicas (Bergagna *et al.*, 2009; Cvetnić *et al.*, 2009; Garin-Bastuji *et al.*, 2000; Godfroid *et al.*, 1994; Grégoire *et al.*, 2012; Melzer *et al.*, 2007). En algunos casos, se han usado tests diagnósticos disponibles comercialmente para especies domésticas, directamente y sin realizar ninguna validación previa de su eficacia diagnóstica para el jabalí (Al Dahouk *et al.*, 2005a; Closa-Sebastià *et al.*, 2010; Hinić *et al.*, 2009; Leuenberger *et al.*, 2007; Melzer *et al.*, 2007; Montagnaro *et al.*, 2010; Vicente *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2011). El principal defecto metodológico de todos estos estudios es que las técnicas comerciales usadas no fueron nunca previamente validadas de forma adecuada para su uso en jabalí, y en algunos casos, tampoco para el ganado porcino, por lo que todos estos estudios son muy discutibles desde el punto de vista metodológico y, por tanto, de dudoso valor científico. Además de la potencial falta de sensibilidad de las técnicas utilizadas, un problema muy relevante es su falta de especificidad. No hay que olvidar que existen reacciones cruzadas entre las especies lisas de *Brucella* y otras bacterias Gram-negativas, entre las que destaca principalmente *Yersinia enterocolitica* O:9 (Algers *et al.*, 2009; Corbel, 1985; Gerbier *et al.*, 1997; Kittelberger *et al.*, 1995; MacMillan, 1990; Muñoz *et al.*, 2005), cuya prevalencia en las especies silvestres es prácticamente desconocida, y que podrían dar lugar a importantes errores diagnósticos (Al Dahouk, *et al.*, 2005a; Jungersen *et al.*, 2006). De hecho, tanto el cerdo como el jabalí pueden infectarse por *Y. enterocolitica* O:9 (Fredriksson-Ahomaa *et al.*, 2009; Fredriksson-Ahomaa *et al.*, 2011; McNally *et al.*, 2004). En definitiva, la validación adecuada de las técnicas utilizadas para la determinación de la seroprevalencia de brucelosis en la fauna silvestre debería ser absolutamente imprescindible para que los resultados obtenidos tuviesen el suficiente valor (Muñoz *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta la gran importancia que tiene utilizar una prueba diagnóstica validada, nosotros decidimos utilizar un iELISA validado con sueros *gold standard* obtenidos de ganado porcino doméstico, y por tanto, la especie más relacionada filogenéticamente con el jabalí (Muñoz *et al.*, 2010; Muñoz *et al.*, 2012). Este iELISA validado con sueros *gold standard* de las correspondientes especies domésticas más relacionadas filogenéticamente, ha permitido una adecuada estimación de la

seroprevalencia de brucelosis en ungulados silvestres, incluyendo el jabalí (Muñoz *et al.*, 2010).

La seroprevalencia media obtenida en nuestro estudio en jabalíes ha sido del 21,73% (IC 95%: 19,76-23,84), resultando muy similar a la observada anteriormente en los estudios parciales realizados por nuestro equipo en Aragón (Martínez *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2010) y España (Muñoz *et al.*, 2010), así como en países de nuestro entorno como Alemania -22%- (Al Dahouk *et al.*, 2005a), Croacia -29,40%- (Cvetnić *et al.*, 2003) y Francia -29%- (Garin-Bastuji *et al.*, 2000). Sin embargo estudios similares realizados en otros países han resultado en seroprevalencias significativamente más bajas (Bergagna *et al.*, 2009; Hubálek *et al.*, 2002; Köppel *et al.*, 2007). Los estudios relativos a la presencia de brucelosis en jabalí en nuestro país han sido muy limitados (Closa-Sebastià *et al.*, 2010; Muñoz *et al.*, 2010; Risco *et al.*, 2013; Ruiz-Fons *et al.*, 2006; Vicente *et al.*, 2002). La brucelosis en el jabalí muestra una elevada seroprevalencia en Aragón con una distribución que afecta a la práctica totalidad de las comarcas estudiadas. En una investigación reciente llevada a cabo en Cataluña y utilizando un inmuno-enzimoincubación de competición (cELISA), se obtuvo una seroprevalencia muy baja con respecto a la puesta en evidencia por nosotros (Closa-Sebastià *et al.*, 2010). Sin embargo, la ausencia de validación del test diagnóstico usado reduce o elimina completamente la significación de los resultados obtenidos. Sin embargo, otros trabajos españoles basados en la utilización de un iELISA correctamente validado para el jabalí (Muñoz *et al.*, 2010) o en la prueba de RBT (Ruiz-Fons *et al.*, 2006; Vicente *et al.*, 2002), han resultado en valores de seroprevalencia muy próximos a los encontrados en este trabajo.

En Aragón, tan solo se han publicado datos parciales al respecto de la brucelosis producida por *B. suis* biovar 2 en jabalí (Martínez *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2010), pero que ponían en evidencia que se trata de un problema grave. Este trabajo confirma completamente estos datos preliminares, tras haber realizado un muestreo sistemático de varios años de duración, incorporando un número muy elevado de muestras y englobando la práctica totalidad del territorio aragonés (figura 9, tabla 6). En nuestra región, la inmensa mayoría de los cotos de caza son totalmente abiertos, sin ningún tipo de vallado, y no se realiza ningún aporte de alimentación, ni soporte reproductivo que pudiera interferir en la dinámica poblacional del jabalí. Sin embargo, en los cotos de caza vallados del sur de España se realiza una intervención directa muy importante en la gestión cinegética, con un aporte artificial de alimentación que facilita unas densidades

poblacionales elevadas e incrementa la agregación de los jabalíes, favoreciendo el contagio con *B. suis*. Esto puede explicar que la seroprevalencia obtenida en estas condiciones alcance valores muy elevados, llegando en ocasiones hasta el 100% en aquellas fincas cerradas en las que se realiza un manejo intensivo del jabalí (Muñoz *et al.*, 2010; Risco *et al.*, 2013). Es importante indicar también que, a diferencia de lo que ocurre en nuestra región, estas fincas cinegéticas suelen compartir territorio con explotaciones de porcino ibérico extensivas, muchas de ellas infectadas endémicamente por *B. suis* biovar 2 (Muñoz *et al.*, 2010), lo cual puede ser un factor adicional de persistencia de dicha bacteria en el ambiente y, en consecuencia, un factor adicional que facilita los contagios.

La brucelosis en el jabalí en nuestra región podría tratarse de un evento relativamente reciente, o bien constituir un problema establecido endémicamente. En nuestro estudio la seroprevalencia obtenida fue muy elevada y no detectamos diferencias significativas en su evolución a lo largo de las cuatro temporadas de caza estudiadas (tabla 6), ni tampoco se detectaron diferencias significativas desde el 2003 al 2008 (Martínez *et al.*, 2008). Esta elevada y relativamente estable seroprevalencia sugiere que la brucelosis del jabalí es un problema establecido endémicamente en Aragón y, posiblemente, también en España.

Los resultados de un reciente estudio llevado a cabo en la península ibérica sobre la situación de la brucelosis en rumiantes silvestres, contrastan con la elevadísima seroprevalencia encontrada en el jabalí en ese mismo estudio, y también con los del presente estudio. Dicho estudio concluyó que los rumiantes silvestres no actúan como reservorios de brucelosis en la península ibérica (Muñoz *et al.*, 2010), por lo que deben considerarse como hospedadores accidentales de la brucelosis, que les es transmitida a través de contactos con el ganado doméstico infectado (Gortázar *et al.*, 2007a; Muñoz *et al.*, 2010). Por el contrario, la seroprevalencia obtenida en el jabalí fue muy elevada, por lo que esta especie silvestre constituye sin duda el reservorio principal de la infección por *B. suis* biovar 2 para el ganado porcino (Muñoz *et al.*, 2010). Los resultados de nuestro estudio confirman plenamente esta situación, por lo que el jabalí debe ser considerado como el reservorio silvestre de la brucelosis porcina en Aragón.

La seroprevalencia identificada en nuestra región variaba considerablemente en función de las diferentes comarcas analizadas, con rangos (descartando las comarcas en

las que se analizaron muy pocas muestras) desde aproximadamente el 10% hasta más del 40% (figura 9, tabla 6). Estas variaciones entre regiones/comarcas de una misma zona de estudio se han puesto también en evidencia en estudios similares en Croacia (Cvetnić *et al.*, 2009), Francia (Garin-Bastuji *et al.*, 2000) y Suiza (Leuenberger *et al.*, 2007). Por el contrario, en los estudios realizados en Bélgica la seroprevalencia obtenida fue elevada pero bastante homogénea (Grégoire *et al.*, 2012). La variabilidad identificada en estos estudios podría ser achacable a las diferentes técnicas analíticas usadas, o también a otras razones. La variación detectada entre las comarcas aragonesas no puede ser achacable a la técnica diagnóstica usada, ya que todos los sueros fueron analizados con el mismo iELISA, que posee un valor diagnóstico adecuado en el jabalí (Muñoz *et al.*, 2010; Muñoz *et al.*, 2012). Tampoco podría ser achacable a diferencias en el manejo poblacional del jabalí en las diferentes comarcas, ya que en todos los casos se trataba siempre de animales de vida libre, situados en cotos de caza totalmente abiertos y en los que no se aplicaba ninguna alimentación suplementaria o manejo cinegético especial por parte del hombre, y que pudiese haber influido en la densidad poblacional (Gortázar *et al.*, 2006). Otro factor a tener en cuenta podría ser la diferente densidad de jabalí en cada comarca. Aunque no se dispone de datos precisos de la densidad poblacional de jabalí en la totalidad de comarcas, estos si que se conocen con suficiente precisión en el Pirineo occidental aragonés y el valle medio del Ebro (Herrero, 2002). El Pirineo occidental coincide en parte con la comarca de La Jacetania, mostrando una densidad de 3,3 jabalíes por km², que puede considerarse como relativamente alta. La seroprevalencia identificada en esta comarca fue del 10,24%. La zona del valle medio del Ebro se encuentra distribuida en 3 comarcas como son D.C. Zaragoza, Los Monegros y la Ribera Baja del Ebro, que cuentan con una densidad de menos de 1 jabalí por km² y, sin embargo, la seroprevalencia en estas comarcas fue próxima al 30%. La explicación a estos aparentemente ilógicos resultados podría deberse a las importantes diferencias en las características ecológicas de ambas zonas. En el valle medio del Ebro se produce una mayor agregación de grupos de jabalíes entorno al cultivo de maíz, que es uno de sus alimentos preferidos. Este cultivo intensivo proporciona alimento y protección adecuada al jabalí, que provoca cuantiosos daños agrícolas (Herrero, 2002; Herrero *et al.*, 2006). Esta mayor agregación de jabalíes, facilita un mayor contacto entre individuos, favoreciendo el contagio con *B. suis*.

Otros factores que pueden explicar la variabilidad en la seroprevalencia por comarcas serían la abundancia relativa y la distribución de las poblaciones de jabalí en Aragón. El jabalí está presente en todos los continentes con una distribución muy amplia debida a su expansión natural y a los traslados efectuados por el hombre (Oliver, 1993). Su número y distribución están aumentando tanto en España, como en Aragón (Gortázar *et al.*, 2000; Osuna *et al.*, 2006), así como en toda Europa (Sáez-Royuela & Tellería, 1986). Una elevada distribución de animales puede facilitar el mantenimiento y la transmisión de enfermedades entre las diferentes poblaciones de jabalí (Gortázar *et al.*, 2006; Vicente *et al.*, 2006). Diversos factores ambientales pueden afectar a la distribución y la abundancia relativa de la fauna silvestre como los aspectos climáticos, la actividad humana, ciertos factores ecológicos y la topografía (Acevedo *et al.*, 2005). Por ejemplo, los factores climáticos influyen en la dinámica de poblaciones del jabalí por su efecto directo en la disponibilidad de alimento y la fijación del período de cría (Fernández-Llario & Mateos-Quesada, 2005). Además, la presión cinegética influye considerablemente en la dinámica poblacional del jabalí (Gabor *et al.*, 1999). En Aragón, se ha demostrado que la abundancia de jabalí está fuertemente influenciada por factores de estructuración del paisaje, ya que la disponibilidad de recursos alimenticios y una cubierta vegetal protectora son factores críticos en la abundancia de esta especie (Acevedo *et al.*, 2006).

La variabilidad de seroprevalencia encontrada entre comarcas podría ser debida también a la existencia de la enfermedad en las especies domésticas como, por ejemplo, los rumiantes o el porcino manejados en condiciones extensivas, al poder estas actuar como fuentes de transmisión para el jabalí. Sin embargo, en Aragón la brucelosis bovina, además de estar producida por una especie bacteriana diferente (*B. abortus*), ha sido erradicada hace ya varios años en nuestra región. La brucelosis en ovino y caprino esta producida también por otra especie bacteriana (*B. melitensis*), y su prevalencia en Aragón es ya puramente testimonial desde hace varios años (RASVE, 2013). Por el contrario, el ganado porcino, podría ser una fuente de infección para el jabalí ya que varios brotes de brucelosis porcina producidos por *B. suis* biovar 2 han sido diagnosticados recientemente en nuestra región (Muñoz, P.M. y Blasco, J.M. comunicación personal). Sin embargo, la implicación de los cerdos domésticos en la epidemiología de la brucelosis en el jabalí debería ser mínimo ya que, a diferencia de otras regiones españolas en las que existe un importante censo de porcino ibérico extensivo. El ganado porcino en Aragón se cría en grandes explotaciones intensivas de ciclo cerrado y de elevada bioseguridad, que

hace extraordinariamente improbable la transmisión de la infección al jabalí (Blasco, 2011).

Finalmente, las diferencias encontradas tampoco deberían ser achacables al número, sexo o edad de animales muestreados, ya que no han existido diferencias reseñables en dichos parámetros en los muestreos realizados por comarcas. De hecho, en aquellas comarcas en las que se tomó un número muy importante de muestras (140 o más), se pusieron también en evidencia variaciones importantes de seroprevalencia (tabla 6).

La manera más adecuada para determinar la edad en el jabalí se basa en patrones de erupción dental (Sáenz de Buruaga *et al.*, 1991), pero esta metodología es relativamente compleja y necesita bastante entrenamiento. Somos pues conscientes de las deficiencias y subjetividad de nuestro método para determinar la edad del jabalí, lo que hace muy complicado comparar nuestros resultados con los de otros estudios similares. Sin embargo, la extrapolación de la edad de los animales en función de su tamaño nos pareció una alternativa sencilla y práctica para evitar confusiones y unificar criterios entre los numerosos cazadores y guardas de caza involucrados en la toma de datos. Teniendo estas limitaciones en consideración, la seroprevalencia obtenida fue mucho mayor en jabalíes adultos que en los jóvenes (tabla 8). Esto parece bastante lógico, ya que los jabalíes adultos tienen una mayor probabilidad de exposición frente a *B. suis* que los animales jóvenes dentro de la misma población (Closa-Sebastià *et al.*, 2010; Gresham *et al.*, 2002; Leuenberger *et al.*, 2007). Esta mayor seroprevalencia en los animales adultos puede ser explicada también por la naturaleza sexual de la transmisión de la infección (Algers *et al.*, 2009; Alton, 1990; Metcalf *et al.*, 1994; Olsen *et al.*, 2012) y el comportamiento social del jabalí, puesto que solo los animales adultos participan activamente en la reproducción, mientras que los jabalíes jóvenes no son activos sexualmente (Azorit & Moro, 2010; Mauget & Boissin, 1987). Al igual que ocurre en el caso de las especies domésticas infectadas por otras brucelas, la cubrición y el parto-aborto constituyen probablemente las fases productivas de mayor riesgo de transmisión de la infección por *B. suis* (Algers *et al.*, 2009; Alton, 1990; Metcalf *et al.*, 1994; Olsen *et al.*, 2012).

Por otra parte, los jabalíes machos presentaron una seroprevalencia mayor que las hembras (tabla 7). La diferencia de infección entre sexos es compatible con la conducta polígama de los machos (Azorit & Moro, 2010; Closa-Sebastià *et al.*, 2010; Rosell &

Herrero, 2002), teniendo presente lo indicado anteriormente respecto a la naturaleza sexual de la transmisión que, en lógica consecuencia, tendrán un mayor riesgo de contagio que las hembras.

Son muy escasos los estudios de brucelosis en fauna silvestre que complementan la simple determinación de la seroprevalencia con estudios bacteriológicos que demuestren la existencia real del problema, ya que el aislamiento de *Brucella* a partir del animal afectado, constituye la única prueba inequívoca demostrativa de la infección (Olsen *et al.*, 2012), por lo que el cultivo microbiológico se considera como la mejor prueba *gold standard* para el diagnóstico de la brucelosis (Garin-Bastuji & Blasco, 1997; Nielsen, 2012). Sin embargo, esto también podría hacerse teóricamente mediante la identificación del ADN de *Brucella* spp. extraído directamente de los tejidos y utilizando técnicas de PCR. Estas herramientas moleculares son muy valiosas para identificar ADN bacteriano, y la extracción directa de dicho ADN desde muestras tisulares de animales sospechosos es considerada por algunos como una buena alternativa a la bacteriología convencional para el diagnóstico certero de la brucelosis (Amin *et al.*, 2001; Bricker, 2002; Grégoire *et al.*, 2012; Hinić *et al.*, 2009; Ilhan *et al.*, 2007; Ilhan *et al.*, 2008; Leyla *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2011; Yu & Nielsen, 2010). De hecho, la mayor parte de estos estudios concluyen en una mayor sensibilidad de la PCR con respecto a la bacteriología convencional. Sin embargo, cuando se utiliza una metodología diagnóstica adecuada, la sensibilidad de la bacteriología convencional es siempre superior a la prueba de PCR para el diagnóstico directo de la brucelosis (Manterola *et al.*, 2003; Romero *et al.*, 1995) y ninguna de las técnicas basada en la detección directa de ADN de *Brucella* en los tejidos se ha mostrado actualmente más sensible que la bacteriología convencional, particularmente cuando esta es realizada con las muestras, medios de cultivo y sistemática adecuados (Manterola *et al.*, 2003; Romero *et al.*, 1995). Es por ello que en nuestro caso, pese a disponer de mucha experiencia y suficientes herramientas moleculares a nuestro alcance, decidimos realizar el diagnóstico directo a través del aislamiento bacteriológico en los animales seropositivos mediante métodos de microbiología convencionales (Alton *et al.*, 1988), pero empleando una combinación adecuada de muestras y medios selectivos (de Miguel *et al.*, 2011; Farrell, 1974; Marín *et al.*, 1996b), y utilizando las herramientas moleculares exclusivamente para la identificación y caracterización genética de las cepas de *B. suis* que logramos aislar (ver más adelante). En estudios similares se han usado diversos medios de cultivo, siendo el medio de Farrell (Farrell, 1974) en combinación con otros

medios no selectivos, la estrategia más ampliamente utilizada (Bergagna *et al.*, 2009; Cvetnić *et al.*, 2003; Cvetnić *et al.*, 2009; De Massis *et al.*, 2012; Godfroid *et al.*, 1994; Grégoire *et al.*, 2012). Sin embargo, ha sido bien demostrado que alguno de los antibióticos contenidos en el medio de Farrell inhiben el crecimiento de varias especies de *Brucella*, incluyendo *B. suis* (de Miguel *et al.*, 2011; Marín *et al.*, 1996a). En consecuencia, todos los estudios realizados al respecto adolecen de una importante falta de sensibilidad para el diagnóstico de *B. suis*, una especie cuyo crecimiento es particularmente inhibido por el medio de Farrell (de Miguel *et al.*, 2011). Además, el tipo y naturaleza de las muestras sometidas a estudio bacteriológico es de importancia trascendental para obtener la máxima sensibilidad diagnóstica. En trabajos similares se han utilizado exclusivamente el bazo y tonsilas (Godfroid *et al.*, 1994; Grégoire *et al.*, 2012), lo que puede explicar la relativamente baja frecuencia de aislamientos obtenidos. En otros estudios, por el contrario, la eficacia diagnóstica ha sido considerablemente superior al utilizarse diversas muestras y tejidos de cada animal (Bergagna *et al.*, 2009; Cvetnić *et al.*, 2003; Cvetnić *et al.*, 2009; Hinić *et al.*, 2009; Leuenberger *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2011). En nuestro caso hemos procurado, en la medida de lo posible, tomar muestras de diferentes órganos y tejidos (tabla 16), en asociación con los mejores medios de cultivo y de las condiciones de siembra (de Miguel *et al.*, 2011), para obtener la máxima probabilidad de aislamiento. De esta manera, la infección por *B. suis* biovar 2 se ha demostrado prácticamente en un tercio de los jabalíes sometidos a estudio (tabla 11), que puede considerarse solo como moderada. Sin embargo, cuando el número y calidad de las muestras eran altos, la eficacia diagnóstica aumentó considerablemente. De particular relevancia es el número de muestras examinadas de cada animal, ya que cuando se sometieron a estudio bacteriológico entre 4 y 5 muestras por cada animal, la frecuencia de aislamiento fue muy elevada, oscilando entre el 65,38 y el 80% (tabla 17). Además, la experiencia en la recogida de muestras es de una importancia crucial, ya que la frecuencia de aislamiento disminuyó a más de la mitad ($p < 0,001$) cuando la muestra fue tomada por personas ajenas a nuestro grupo de investigación (tabla 15). Esta mayor frecuencia de aislamiento por nuestra parte, podría deberse también a la mejor atención y cuidado que nosotros dedicamos a la hora de tomar las muestras, evitando la contaminación con bacterias saprofitas que dificultan el posterior aislamiento de *B. suis* biovar 2 (de Miguel *et al.*, 2011). Las muestras tomadas por nosotros, además, fueron refrigeradas inmediatamente, procediéndose a su posterior congelación en el menor tiempo posible para evitar procesos de autólisis. Es importante considerar que la

congelación de las muestras no modifica significativamente el aislamiento microbiológico de *B. suis* biovar 2 con respecto a la utilización de muestras frescas (Hinić *et al.*, 2009). En cualquier caso, la eficacia final del diagnóstico bacteriológico ha sido muy próxima a la obtenida en estudios realizados con metodología similar (Cvetnić *et al.*, 2003; Muñoz *et al.*, 2010), pero muy superior a la obtenida en otros estudios que han utilizado estrategias diferentes y que presentan los importantes problemas metodológicos y conceptuales mencionados antes (Closa-Sebastià *et al.*, 2010; Gennero *et al.*, 2006; Grégoire *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2011).

Nuestros resultados microbiológicos guardaron, en general, un estrecho paralelismo con los resultados serológicos. En este sentido, una de nuestras principales preocupaciones era la especificidad de la estrategia utilizada y, más concretamente, determinar si la frecuencia de aislamiento hubiese aumentado significativamente en el caso de haber analizado también todos los animales seronegativos en el iELISA. Sin embargo, en los 9 animales seronegativos que fueron encontrados muertos y que analizamos bacteriológicamente (un número adecuado de muestras de elevada calidad), no fuimos capaces de obtener aislamiento alguno. Además, para asegurarnos de la adecuada especificidad de nuestra estrategia, las muestras de órganos y tejidos de un total de 50 jabalíes seronegativos tomados al azar fueron sometidos a cultivo, resultando siempre cultivo negativo en todos los casos (resultados no mostrados), demostrando en consecuencia que la estrategia usada fue correcta.

B. suis biovar 2 fue aislada en 28 de las 33 comarcas que componen Aragón, quedando por tanto demostrada su amplia distribución, que parece encontrarse perfectamente distribuida en la totalidad de Aragón, al igual que ocurre en la península ibérica (Muñoz *et al.*, 2010) y, en general, en toda Europa (Algers *et al.*, 2009). En sincronía con los resultados del estudio serológico, existió también mucha variabilidad en la frecuencia de aislamientos en las diferentes comarcas (figura 10, tabla 11). Como se ha comentado antes para el caso del estudio serológico, son diversos los factores comunes que podrían explicar también la variación en la frecuencia de aislamiento de *B. suis* biovar 2 entre comarcas. Además de la gran importancia ya comentada del número, origen y calidad de las muestras, la diferente seroprevalencia y el número de cultivos realizados por comarca, podrían explicar también las diferencias obtenidas. Las comarcas con elevada frecuencia de aislamiento de *B. suis* biovar 2 poseían, en general,

una elevada seroprevalencia y, por tanto, una mayor cantidad de muestras adecuadas para cultivo (tablas 6 y 10).

A diferencia de lo ocurrido con los resultados serológicos, no fuimos capaces de poner en evidencia diferencias significativas en la frecuencia de aislamientos en función del sexo y edad de los jabalíes, si bien esta fue algo mayor en los machos que en las hembras y en los animales jóvenes que en los adultos (tablas 12 y 13). Los tejidos más utilizados fueron el linfonodo mandibular, el bazo, el testículo y el epidídimo, pero también otros órganos y tejidos. Las frecuencias de aislamiento más elevadas se obtuvieron en el linfonodo mandibular, mamario y escrotal, así como en el bazo y epidídimo (tabla 16). En consecuencia, estos deberían ser considerados como los órganos de elección para el aislamiento de *B. suis* biovar 2 en el jabalí, y demuestran la relativamente elevada frecuencia de infección de los órganos del aparato genital en esta especie. Esto coincide plenamente con lo descrito en otros estudios (Hinić *et al.*, 2009; Leuenberger *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2011), y ratifican que la vía genital puede jugar un papel determinante en la transmisión de *B. suis* biovar 2 en el jabalí. Por otro lado, la elevada frecuencia de aislamiento de *B. suis* biovar 2 en los linfonodos mandibulares sugiere que la mucosa oral podría ser una de las principales vías de entrada, en sincronía con los hábitos alimentarios del jabalí, que suele ingerir los fetos abortados y las envolturas fetales (Abril *et al.*, 2011; Olsen *et al.*, 2012). Otro resultado destacable fue la elevada frecuencia de aislamientos en los linfonodos mamaros (tabla 16). Las infecciones por *Brucella* en los animales tienden a cronificarse y localizarse de una manera particularmente frecuente en los linfonodos mamaros, con la subsiguiente excreción en la leche (Enright, 1990; Rhyan *et al.*, 2009; Rhyan, 2013; Thoen *et al.*, 1993). Esta excreción en leche podría ocurrir también en el jabalí, constituyendo una importante vía de transmisión. El bazo es seguramente el órgano que con mayor frecuencia se muestrea en los programas de vigilancia sanitaria en fauna silvestre, siendo muy útil para el diagnóstico etiológico de diferentes patologías (Arnal, 2011; RASVE, 2011; Revilla, 2012). En nuestro estudio, aunque generalmente no ha sido tan adecuado como los linfonodos descritos antes, el bazo es también un órgano que proporcionó una buena sensibilidad para el diagnóstico de *B. suis* biovar 2. La frecuencia de aislamientos que nosotros obtuvimos en bazo fue mayor que la obtenida en otros estudios, pero estos usaron una metodología diferente (Grégoire *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2011).

Todas las cepas aisladas se identificaron como *Brucella* spp. mediante técnicas de microbiología convencional (Alton *et al.*, 1988), así como a través del análisis de su ADN (Closa-Sebastià *et al.*, 2010; Grégoire *et al.*, 2012; Muñoz *et al.*, 2010; Nielsen, 2012). Todas las cepas aisladas fueron identificadas definitivamente como *B. suis* biovar 2. Las cepas aisladas fueron caracterizadas genéticamente mediante PCR-RFLP's de los genes *Omp31*, *Omp2a* y *Omp2b* (Cloeckert *et al.*, 1995; Vizcaíno *et al.*, 1997), una técnica que permite una diferenciación precisa de los 6 haplotipos descritos hasta ahora para la biovar 2 de *B. suis* (Muñoz *et al.*, 2010). Ninguna de las cepas aisladas se correspondió con el haplotipo característico de la cepa Thomsen de referencia. Este haplotipo se aísla con cierta frecuencia en diferentes países europeos, pero nunca ha sido puesto en evidencia en España. Además, ninguna de las cepas aisladas presentó el genotipo característico de la cepa ibérica minoritaria (aislada en el sur de España), ni se correspondió con ninguno de los dos haplotipos de liebre europea *Lepus europaeus* identificados en Europa (Blasco, J.M. comunicación personal; Ferrão-Beck *et al.*, 2006; García-Yoldi *et al.*, 2007; Muñoz *et al.*, 2010). Los dos genotipos de *B. suis* biovar 2 identificados en nuestro estudio fueron exclusivamente el ibérico mayoritario y el centroeuropeo, el segundo predominando ampliamente sobre el primero. Ambos haplotipos ya habían sido descritos anteriormente en jabalíes en Aragón (Martínez *et al.*, 2010; Muñoz *et al.*, 2010) y, en el caso del centroeuropeo, también en otros países europeos (Ferrão-Beck *et al.*, 2006; García-Yoldi *et al.*, 2007). Sin embargo, a diferencia de lo observado en Aragón, el haplotipo centroeuropeo nunca ha sido puesto en evidencia en las regiones del sur de España, en las que, hasta ahora, se han aislado exclusivamente los dos haplotipos ibéricos (Muñoz *et al.*, 2010). La distribución del haplotipo centroeuropeo de *B. suis* biovar 2 en jabalí en Aragón muestra un patrón muy homogéneo, estando diseminado por todas las comarcas en las que se obtuvieron aislamientos. Sin embargo, la distribución del haplotipo ibérico mayoritario fue más restringida, estando presente tan solo en 7 comarcas ubicadas por el centro y noreste de Aragón (figura 15). El haplotipo centroeuropeo ha sido descrito como responsable de brotes de brucelosis en porcino doméstico en Croacia y Francia y aislado también en jabalí en Alemania, Bélgica, Francia, Italia y Suiza (García-Yoldi *et al.*, 2007). Este haplotipo acaba de ser recientemente identificado también como responsable de un brote de brucelosis en porcino doméstico en Aragón (Blasco, J.M. comunicación personal). Por el contrario, ninguno de los haplotipos ibéricos ha sido aislado fuera de España, salvo en dos casos (Rumanía y Polonia), y ambos relacionados con una exportación de cerdos procedentes de España (Blasco, J.M. comunicación personal). El

haplotipo ibérico mayoritario es el responsable de la inmensa mayoría de los actuales brotes de brucelosis porcina que ha ocurrido recientemente en las explotaciones españolas (Blasco, J.M. comunicación personal).

La presencia de ambos genotipos de *B. suis* biovar 2 en Aragón podría tener diferentes explicaciones. El haplotipo ibérico mayoritario podría haber existido siempre de forma natural, tal y como ocurre en el sur del país, o bien, podría haberse introducido en Aragón a través de movimientos de jabalíes desde zonas del sur de España (Soriguer *et al.*, 1998). Aunque bastante improbable por la naturaleza de nuestra producción porcina intensiva, el jabalí en Aragón podría haberse infectado a través del contacto con materiales contaminados procedentes de explotaciones de porcino intensivo infectadas con este genotipo. El haplotipo centroeuropeo podría igualmente haber existido siempre de forma natural. Otra posibilidad podría ser consecuencia de los movimientos transpirenaicos de la especie y del contacto con jabalíes infectados procedentes de Europa, puesto que este animal es capaz de realizar desplazamientos importantes (Rosell *et al.*, 2001). En cualquier caso, con los datos que poseemos hasta ahora no podemos concluir si la infección del jabalí se originó a partir de los cerdos domésticos infectados o el caso inverso, que parece una hipótesis mucho más plausible por la existencia de un claro ciclo silvestre, al menos para la biovariedad 2 de *B. suis* (Algers *et al.*, 2009). Algunas de estas hipótesis serán seguramente confirmadas en los próximos años, cuando se conozcan los resultados de los estudios en curso y basados en el análisis de marcadores moleculares más sensibles (como por ejemplo los VNTR) sobre un número importante de cepas de *B. suis* biovar 2 aisladas de jabalíes, liebres europeas y cerdos domésticos en los diferentes países europeos.

Las lesiones observadas en el jabalí infectado por *B. suis* biovar 2 son esencialmente las mismas que las descritas en el porcino doméstico (Algers *et al.*, 2009; Enright, 1990; Olsen *et al.*, 2012). En estudios similares al nuestro, la existencia de lesiones relacionadas con la brucelosis no fue investigada (Bergagna *et al.*, 2009; Leuenberger *et al.*, 2007; Muñoz *et al.*, 2010), o bien, se concluyó en una ausencia de lesiones macroscópicas compatibles con la enfermedad (Godfroid *et al.*, 1994; Grégoire *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2011). En consecuencia, es aceptado ampliamente que *B. suis* biovar 2 puede aislarse en tejidos de animales sanos sin lesiones evidentes (Godfroid, 2002), lo que es interpretado por algunos como un indicador de la baja patogenicidad de esta bacteria para el jabalí. Sin embargo, con una frecuencia baja, algunos estudios han descrito la presencia de

lesiones macroscópicas en jabalíes infectados por *B. suis* biovar 2, sobre todo orquitis y epididimitis (Cvetnić *et al.*, 2003; Garin-Bastuji *et al.*, 2000). Por ello, más que a la baja patogenicidad de *B. suis* biovar 2, la escasa frecuencia de lesiones evidenciada en los jabalíes infectados podría ser debida simplemente a que en la mayoría de estudios de campo realizados, las muestras han sido tomadas por personas sin ninguna experiencia clínica (cazadores y guardas de caza), y por tanto, las lesiones pueden pasar desapercibidas. Nuestro estudio resultó también en una baja frecuencia de lesiones macroscópicas compatibles con la enfermedad ya que tan solo identificamos 3 casos con lesiones macroscópicas sospechosas, dos de los cuales fueron confirmados perfectamente mediante aislamiento bacteriológico a partir del tejido lesionado y mediante inmunohistoquímica, que reveló la presencia de *B. suis* en el interior de células fagocíticas (figura 17). La presencia de lesiones en el epidídimo de ambos jabalíes, junto a la elevada frecuencia de aislamientos realizados en epidídimo (tabla 16) que no presentaban lesiones aparentes macroscópicamente, sugiere que la vía genital juega un papel importante en la transmisión de *B. suis* en el jabalí, de igual manera que ocurre en el porcino doméstico (Acha & Szyfres, 2001; Olsen *et al.*, 2012). La consecuencia de estas lesiones genitales podría ser una esterilidad temporal o permanente según el grado de lesión, que podría actuar como un factor regulador de la dinámica poblacional del jabalí.

5.2.- ESTUDIOS EN LA LIEBRE

En Aragón existen dos especies de liebre, la ibérica *Lepus granatensis* que está extendida prácticamente en toda la región, y la europea *Lepus europaeus*, cuyo límite inferior de distribución en Europa se sitúa precisamente en el norte de España, incluyendo el prepirineo aragonés (Palacios & Meijide, 1979). El número de muestras obtenido durante el periodo de estudio ha sido muy reducido, particularmente en el caso de la liebre europea, por lo que, lamentablemente, en varias comarcas no nos ha sido posible obtener muestras (tabla 2). Por esta razón, para dimensionar el estudio al máximo, se decidió utilizar la seroteca y el banco de tejidos del grupo SEDIFAS, ubicados en la FVUZ. El mayor número de muestras analizadas correspondió a la liebre ibérica, lógica consecuencia de la rareza y limitado rango de distribución de la liebre europea en nuestra región, especie poco abundante y restringida a la zona pirenaica (Ballesteros *et al.*, 1996). Desde mediados de 1960, la población de liebre europea está

disminuyendo en Europa, hasta el punto que la especie está ya considerada en peligro de extinción en algunos países (Misiórowska & Wasilewski, 2012). Diversos factores podrían explicar su declive como la intensificación agrícola, el uso de productos químicos, la pérdida de biodiversidad, el aumento del número de predadores y las enfermedades, entre las que la infección por *B. suis* biovar 2 podría ser relevante, ya que afecta con cierta frecuencia a esta especie, provocándole serias consecuencias patológicas (Algers *et al.*, 2009; Gyuranecz *et al.*, 2011; Stërba, 1982). Quedan ya muy pocos cazadores de liebre europea en el Pirineo, por lo que la mayoría de liebres europeas a las que pudimos acceder correspondían a animales encontrados muertos por traumatismos al borde de carreteras y, en muy pocos casos, se trataba de animales cazados. Esta actividad cinegética precisa de un buen estado físico así como de un perro adiestrado específicamente para este tipo de liebre. Por el contrario, la población de liebre ibérica en Aragón, aunque fragmentada por las modificaciones del medio natural, es estable y relativamente importante (Gortázar *et al.*, 2007b; Purroy, 2011), lo que nos permitió acceder a un número relativamente elevado de muestras para estudiar el problema en esta especie.

Un problema esencial para la realización de estudios de prevalencia de enfermedades en fauna silvestre reside en la elección de la metodología correcta de análisis. Como se ha indicado antes, el diagnóstico directo de la brucelosis basado en el aislamiento e identificación del agente patógeno involucrado es la única prueba diagnóstica incontestable y totalmente específica (Nielsen, 2012). Sin embargo, el cultivo de muestras es muy costoso y complicado para ser llevado a cabo a nivel poblacional y a gran escala, por lo que para determinar la extensión de este proceso patológico en fauna silvestre se recurre a métodos diagnósticos indirectos, y particularmente, a los estudios serológicos. En la práctica totalidad de estos estudios en fauna silvestre, y con muy pocas excepciones (Muñoz *et al.*, 2010), se han aplicado directamente las pruebas serológicas desarrolladas para el ganado doméstico, sin realizarse ningún estudio previo de validación en la especie objeto de estudio. En consecuencia, la inmensa mayoría de los estudios serológicos de brucelosis en fauna silvestre, particularmente aquellos realizados con tests diagnósticos cuantitativos, son inadecuados desde el punto de vista metodológico. En segundo lugar, otro de los problemas esenciales de este tipo de estudios en fauna silvestre reside en la calidad del suero. En el caso de la liebre esto es un factor limitante, ya que por el tipo de caza y la obtención de las muestras, la inmensa

mayoría de sueros que se obtuvieron presentaron un elevado grado de hemolisis, que imposibilita su estudio a través de determinadas técnicas diagnósticas. En el caso de la brucelosis, la hemolisis del suero impide la aplicación de técnicas de aglutinación rápida como la de RBT, que es una técnica reconocida universalmente para el diagnóstico de brucelosis en la práctica totalidad de especies de mamíferos incluida la liebre (Garin-Bastuji & Blasco, 1997; Stěrba & Halacková, 1987). De hecho, en algunos estudios se han usado estas técnicas de aglutinación, pero para ello resultó imprescindible tomar el suero inmediatamente después de la muerte del animal (Baldone *et al.*, 2004; Frölich *et al.*, 2003; Treml *et al.*, 2007; Winkelmayr *et al.*, 2005), algo inaplicable en nuestras condiciones de trabajo. Por esta razón, y puesto que los enzimo-inmunoensayos (ELISA) permiten analizar sueros con alto grado de hemolisis (Neumann & Bonistalli, 2009), y son utilizados frecuentemente para la determinación de la seroprevalencia de la infección en animales silvestres (Davison *et al.*, 2011; Köppel *et al.*, 2007; Lynch *et al.*, 2011; Truong *et al.*, 2011), decidimos utilizar un ELISA. Los ELISA indirectos (iELISA) precisan de conjugados frente a las inmunoglobulinas específicas de la especie animal a estudiar, que no están disponibles comercialmente en la inmensa mayoría de casos. Los resultados de algunos trabajos sugieren que un iELISA con un conjugado policlonal anti-IgG de conejo sería eficaz para la detección de anticuerpos frente a *Brucella* (Szulowski *et al.*, 1999), y otros patógenos (Frölich *et al.*, 2003; Gustafsson & Uggla, 1994; Hotta *et al.*, 2012) en sueros de liebre. Sin embargo, en nuestras condiciones, este conjugado heterólogo no fue capaz de detectar inmunoglobulinas específicas en nuestra población de sueros *gold standard* procedentes de liebres hiperinmunizadas con *B. suis*. Ante la ausencia de dichos conjugados comerciales, en algunos casos se ha recurrido a utilizar otras pruebas como el enzimo-inmunoensayo de bloqueo o competición (cELISA) o incluso la polarización de fluorescencia (FPA), que no precisan de conjugados específicos de la especie a estudiar (Bártová *et al.*, 2010; Gall *et al.*, 2000; Lynch *et al.*, 2011; Nielsen *et al.*, 1999; Nielsen *et al.*, 2005), pero que no han sido validados adecuadamente en liebres, ni en ninguna otra especie silvestre.

Considerando el elevado grado de hemolisis de nuestras muestras (que imposibilitaba la aplicación de técnicas sencillas como la de RBT) y la ausencia de una adecuada validación en liebre de otras pruebas diagnósticas de potencial aplicación multi-especie tales como el cELISA y FPA, decidimos utilizar un iELISA, que lógicamente, debería ser validado previamente para esta finalidad. Puesto que

determinados conjugados multi-especie, como la proteína A o proteína G (o ambas) han sido aplicados satisfactoriamente en otras especies (Muñoz *et al.*, 2010; Nielsen *et al.*, 2004; Nymo *et al.*, 2013), decidimos usarlos también para nuestro estudio en liebres. En el CITA disponíamos de sueros de conejo hiperinmunizados con especies lisas de *Brucella*, que podríamos haber usado para la validación. Sin embargo, aunque los conejos pertenecen a la familia *Leporidae*, la liebre y el conejo constituyen géneros diferentes, por lo que decidimos descartarlos para la validación del iELISA. Puesto que no existían tampoco sueros de referencia de liebre ni de especies relacionadas filogenéticamente, para la mencionada validación tuvimos que generar nuestra propia colección de sueros a partir de liebres europeas criadas en cautividad. Como consecuencia del elevado coste económico de cada ejemplar, el número de liebres empleadas para la validación del iELISA fue necesariamente reducido, pero creemos que el procedimiento de validación (ver capítulo 4.2.1. resultados) realizado fue ajustado y metodológicamente correcto. Nuestra técnica de iELISA, una vez validada, se utilizó para testar el suero tanto de liebres europeas como de liebres ibéricas, puesto que aunque son especies diferentes, están muy relacionadas filogenéticamente y pertenecen al mismo género (Palacios & Meijide, 1979), habiéndose descrito casos de hibridación (Thulin *et al.*, 1997; Thulin *et al.*, 2006). De hecho, estudios basados en el ADN mitocondrial demuestran una hibridación natural en zonas de contacto entre la liebre europea y la liebre ibérica (Marques de Freitas, 2006). Usando nuestro iELISA, que consideramos metodológicamente adecuado y suficientemente validado, se analizaron 261 sueros de liebre (figura 21), resultando todos ellos negativos. Este resultado contrasta claramente con la situación de la enfermedad en las liebres europeas de otros países europeos (Gyuranecz *et al.*, 2011; Höflechner-Pörtl *et al.*, 2000; Szulowski *et al.*, 1999; Trembl *et al.*, 2007; Winkelmayr *et al.*, 2005), si bien es coincidente con la encontrada en otros estudios realizados también en liebre europea (Chiari *et al.*, 2009; Frölich *et al.*, 2003; Poli *et al.*, 1987), y con los realizados hace años en liebre ibérica en Valladolid y Zamora (Rodríguez Alonso *et al.*, 1997), y los obtenidos recientemente en el centro y sur de España (Alzaga, 2010). La ausencia de casos positivos en ambas especies de liebre en nuestro estudio podría indicar la ausencia o una muy baja seroprevalencia de brucelosis en estas especies en Aragón.

Otra posible explicación de la nula seroprevalencia encontrada podría ser debida a la utilización de un iELISA validado incorrectamente. Para descartar defectos en la validación del iELISA y asegurarnos de su adecuada especificidad, e

independientemente de los resultados serológicos, decidimos analizar bacteriológicamente numerosas muestras de ambas especies, tanto recogidas en nuestro estudio, como otras de otras provincias españolas y que estaban almacenadas en nuestro banco de tejidos. La ausencia de aislamientos, utilizando exactamente los mismos procedimientos y medios de cultivo que resultaron muy eficaces para aislar *B. suis* en jabalíes, demuestra que la prevalencia de la brucelosis en liebres en Aragón es nula o muy escasa y, en consecuencia, que el iELISA utilizado había sido correctamente validado. De hecho, la brucelosis causada por *B. suis* biovar 2 ha sido diagnosticada en España en la liebre europea (Lavín *et al.*, 2006), pero nunca en la liebre ibérica, ni en la liebre de piornal *Lepus castroviejoii*. Es por tanto muy posible que tan solo la liebre europea se vea afectada por esta infección. Lamentablemente, el número de ejemplares analizados de esta especie fue relativamente bajo, lo que no permite extraer conclusiones sólidas. Sin embargo, es importante considerar que la prevalencia de brucelosis en liebre europea en Europa es, en general, muy baja (Algers *et al.*, 2009). La transmisión de la enfermedad entre liebres se realiza principalmente por vía genital (Kötsche & Gottschalk, 1974), por lo que al existir núcleos muy aislados de población, la probabilidad de diseminación del proceso en esta especie en Aragón es baja. De hecho, la densidad poblacional de liebre europea en España es notablemente inferior a la encontrada en países de Europa central (Gortázar *et al.*, 2007b). En definitiva, la escasa prevalencia de la enfermedad unida al bajo número de muestras analizadas podría explicar perfectamente nuestros resultados en la liebre europea. Tanto la liebre europea como la ibérica podrían infectarse también a través de contactos con jabalíes, consecuencia de la elevada prevalencia de infección en esta especie. La transmisión de *B. suis* por vía oral se ha comprobado experimentalmente en liebres (Kötsche & Gottschalk, 1974; Rementsova, 1987). Sin embargo, la liebre es un animal herbívoro (Ballesteros *et al.*, 1996), por lo que es poco probable que se alimente de manera similar al jabalí, ingiriendo envolturas fetales potencialmente infectadas por *B. suis*. Además, es también poco probable que la liebre se infecte a través de la vegetación contaminada, ya que aunque conviven con jabalíes, no lo hacen estrechamente compartiendo los mismos hábitats. La liebre prefiere aéreas abiertas como los terrenos agrícolas, mientras que el jabalí aunque se adapta extraordinariamente a todo tipo de hábitats, prefiere zonas cubiertas de abundante vegetación y disponibilidad de recursos. A diferencia de lo que ocurre con la liebre europea, la densidad poblacional de liebre ibérica es adecuada en nuestro país (Ballesteros *et al.*, 1996; Purroy, 2011). El número de sueros de liebre ibérica analizados

ha sido elevado y, además, hemos analizado también sueros de liebre ibérica de diferentes regiones de España (tabla 3). Pese a ello, la totalidad de liebres ibéricas analizadas resultaron también negativas tanto en serología como en cultivo, lo que es coincidente con los estudios realizados en esta especie en España (Alzaga, 2010; Rodríguez Alonso *et al.*, 1997), sugiriendo que esta especie podría no ser susceptible a la infección por *B. suis* biovar 2. Ante la ausencia de aislamientos de *B. suis* en liebres no pudimos aplicar ninguna técnica para su identificación molecular. Sin embargo, las únicas dos cepas de *B. suis* biovar 2 aisladas en liebre europea en España muestran patrones moleculares diferentes a los haplotipos descritos anteriormente en cerdo doméstico y jabalí (Blasco, J.M. comunicación personal). En consecuencia, al menos en España, las cepas que infectan a la liebre europea y al jabalí podrían ser diferentes. Por el contrario, el haplotipo de liebre europea descrito mayoritariamente en Europa (y no identificado hasta la fecha en España), se ha aislado también con cierta frecuencia en jabalí y porcino doméstico en varios países europeos.

Las liebres infectadas por *B. suis* biovar 2 presentan nódulos de diferentes tamaños en órganos internos como bazo, hígado, linfonodos regionales y órganos reproductores (Gyuranecz *et al.*, 2011; Stěrba, 1982; Szulowski *et al.*, 1999; Wibbelt & Frölich, 2005). En ocasiones ha sido necesario un estudio bacteriológico e histológico de liebres encontradas muertas para poder diferenciar la brucelosis de otros procesos que producen lesiones similares, como las infecciones por *Francisella tularensis* y *Yersinia pseudotuberculosis* (Gyuranecz *et al.*, 2010; Stěrba, 1983). En España se ha descrito un caso de brucelosis en liebre europea, en el se identificaron las lesiones típicas de esta enfermedad (Lavín *et al.*, 2006). La ausencia total de lesiones compatibles con brucelosis en las liebres examinadas constituye un elemento adicional que corrobora nuestros resultados serológicos y bacteriológicos, demostrando la escasa o nula prevalencia de brucelosis en las liebres aragonesas.

5.3.- ESTUDIOS EN EL PERRO DE CAZA

Pese a que, para evitar molestias e inconvenientes a los propietarios de las rehalas, la toma de muestras en perros se realizó fuera de la temporada de caza, el número final de muestras obtenido no fue tan elevado como nos hubiese gustado, pero aun así nos aproximamos a las 600 muestras (tabla 22). Uno de los principales factores que han

dificultado la obtención de más muestras ha sido, en gran parte, la preocupación de los dueños por la manipulación de sus perros, y aunque interesados con la finalidad del estudio, se mostraron muy recelosos y en ocasiones desconfiados. Se intentó priorizar el muestreo de los perros que comieran restos de algún jabalí, e idealmente muestreado por nosotros, comprobando este hecho directamente.

Una parte relativamente importante de la población estudiada resultó positiva en la prueba de RBTm, lo que podría sugerir que la brucelosis puede estar presente en los perros de caza en Aragón. Sin embargo, la formación de conclusiones sólidas de nuestro estudio es extremadamente complicada. En primer lugar, un problema de gran importancia es relativo a la técnica analítica usada. Teniendo en consideración la ausencia de técnicas serológicas validadas para el diagnóstico de las infecciones por especies lisas de *Brucella* en perros, y que las muestras de suero que íbamos a tomar serían de calidad y libres de hemolisis, decidimos basar nuestro estudio en la prueba serológica de RBT tanto en su versión estándar (RBTest) como modificada -RBTm (Blasco *et al.*, 1994; Garin-Bastuji & Blasco, 1997). Sin embargo, pese a que la técnica de RBTest es usada y aceptada para el diagnóstico de la brucelosis en prácticamente todas las especies de mamíferos (Garin-Bastuji & Blasco, 1997), nunca ha sido evaluada adecuadamente para el diagnóstico de brucelosis canina, y particularmente en su versión modificada (RBTm). Además, es importante considerar que esta técnica no está exenta de problemas de reacciones cruzadas (Flores-Castro & Carmichael, 1977; Garin-Bastuji & Blasco, 1997), cuya frecuencia e importancia en perros son mayoritariamente desconocidas y ninguna de las cuales ha sido adecuadamente validada para el diagnóstico de brucelosis en perros. La mayor proporción de perros seropositivos se observó en la prueba modificada, y en los animales adultos (tabla 23), no apreciándose diferencias significativas entre sexos. Tampoco hubo diferencias significativas en función del tipo de alimentación. Como teníamos fundadas sospechas de la existencia de problemas de especificidad del método modificado, aplicamos ambas versiones de la prueba RBT en todos los casos, seleccionando para el estudio microbiológico final tan solo aquellos casos que resultaran positivos en ambas técnicas. Un total de 16 animales resultaron positivos a ambas versiones de la prueba de RBT (tabla 25), y sobre los que se trató de centrar el estudio microbiológico. Lamentablemente, por las razones apuntadas anteriormente, tan solo pudimos disponer de muestras para estudio bacteriológico en 4 casos, todos ellos resultando en hemocultivo negativo. Si a este escasísimo número de

muestras analizadas unimos la relativamente baja sensibilidad diagnóstica del hemocultivo realizado en una única muestra de sangre (Hollett, 2006; Wanke, 2004), resulta evidente que nuestros resultados en perros carecen de valor suficiente para concluir si el problema de la infección por *B. suis* biovar 2 (o por otras especies lisas de *Brucella*) afecta a los perros de caza en Aragón.

La mayoría de estudios similares al nuestro con la finalidad de determinar la prevalencia de brucelosis canina se han basado en poblaciones de perros de otra aptitud diferente. En consecuencia, no podemos comparar nuestros resultados con otros obtenidos en perros pastores, que cohabitan o pueden cohabitar estrechamente con animales domésticos infectados. Lógicamente, existen grandes diferencias en la seroprevalencia de brucelosis en perros en función del tipo de población canina que se ha estudiado. En zonas/aptitudes en las que el perro no tiene contacto con animales infectados, o son zonas libres de infección, lo habitual es encontrar resultados negativos (Boeri *et al.*, 2008; Lara-Lara *et al.*, 1993; Truong *et al.*, 2011). Sin embargo, en regiones en las que la brucelosis es un problema importante en los rumiantes, la seroprevalencia encontrada en perros es alta o moderada, como sucede en zonas rurales en países en desarrollo (Akhtardanesh *et al.*, 2011; Almeida *et al.*, 2004). El perro pastor suele ser el más expuesto, habiéndose descrito numerosos casos de brucelosis en perros relacionados con explotaciones ganaderas (Baek *et al.*, 2003; Bello *et al.*, 1978; Forbes, 1990; Prior, 1976), llegando incluso hasta infectarse con cepas vacunales vivas como la Rev-1 (Hinić *et al.*, 2010). En rebaños caprinos infectados por *B. melitensis* se encontró una asociación positiva entre la prevalencia en perros y la observada en caprino (Mikolon *et al.*, 1998). En España, se encontraron diferencias muy importantes entre perros vagabundos y perros con propietario, ya que estos últimos presentaron una seroprevalencia muy inferior a los primeros (Mateu de Antonio & Martín Castillo, 1993). Sin embargo, los estudios de brucelosis en perros de caza son muy limitados, particularmente en lo relativo a la infección por *B. suis*. En Australia y EE.UU. se han puesto en evidencia casos positivos en perros utilizados para cazar cerdos silvestres, que se encuentran frecuentemente infectados por *B. suis* (Moloney, 2012; Ramamoorthy *et al.*, 2011). Por otro lado, un caso de infección por *B. suis* en una explotación porcina ha sido atribuido a un perro (Körmendy & Nagy, 1982). Al igual que ocurre en otras especies domésticas, los perros suelen infectarse al ingerir fetos o envolturas fetales de los abortos (Forbes, 1990; Meirelles-Bartoli *et al.*, 2012; Wanke, 2004).

La ausencia de signos clínicos de brucelosis en los perros de caza explorados por nosotros sería compatible con la baja seroprevalencia encontrada. Es importante tener en cuenta que en perros infectados por *B. suis* se han descrito lesiones como orquitis y epididimitis (Barr *et al.*, 1986; Meirelles-Bartoli *et al.*, 2012; Ramamoorthy *et al.*, 2011). Sin embargo, en todos estos casos se trataba de infecciones no debidas a la biovariedad 2 de *B. suis*. Podría ocurrir que, de igual manera a lo que ocurre en la especie humana, *B. suis* biovar 2 podría ser también muy poco patógena para el perro. De hecho, en el único caso en el que se ha puesto en evidencia la infección por *B. suis* biovar 2 en el perro, el animal infectado carecía de signos clínicos o lesiones evidentes (Körmendy & Nagy, 1982). Aunque la presencia de la infección por *B. suis* biovar 2 en los perros de caza en Aragón no puede descartarse, nuestros resultados sugieren que esta infección no parece representar un problema demasiado relevante, y esto parece ocurrir incluso en aquellos animales con elevado riesgo, ya que gran parte de los perros muestreados consumían restos de jabalíes, que en la zona de estudio se ha demostrado como una especie gravemente afectada por *B. suis* biovar 2.

CONCLUSIONES

6.- CONCLUSIONES

1. La elevada prevalencia de brucelosis en el jabalí y su amplia distribución, apuntan a esta especie como principal reservorio silvestre de la infección por *B. suis* biovar 2 en Aragón, con el consiguiente riesgo sanitario en explotaciones de ganado porcino, particularmente de tipo extensivo o semiextensivo.
2. La prevalencia de la infección en el jabalí no varía significativamente entre las diferentes temporadas de caza, por lo que la brucelosis no parece tratarse de un problema de reciente aparición en esta especie silvestre, sino que está establecida endémicamente, afectando de manera más frecuente a los animales adultos (particularmente los machos).
3. La probabilidad de obtener un resultado bacteriológico positivo en nuestro estudio en el jabalí aumentó de manera proporcional al número de muestras analizadas y, principalmente, a la calidad del muestreo.
4. *B. suis* biovar 2 constituye la única etiología de la brucelosis en el jabalí. El estudio genético de las cepas aisladas demuestra que, al igual que ocurre en el resto de Europa, el haplotipo centroeuropeo de esta biovariedad es el principal responsable del problema, pero no el único, en Aragón.
5. Pese a las escasas lesiones clínicas observadas en jabalíes infectados, la identificación de lesiones en el epidídimo en algunos animales y la elevada frecuencia de aislamientos realizados en este órgano, sugieren que la vía genital podría desempeñar un papel importante en la transmisión de *B. suis* biovar 2 en el jabalí.
6. La prevalencia de brucelosis es nula o muy escasa en las dos especies de liebre presentes en Aragón, mediante la técnica de enzimo-inmunoensayo indirecto (iELISA) validada específicamente en el presente estudio. Sin

embargo, mientras que el número de liebres ibéricas analizadas fue adecuado, las muestras de liebre europea fueron escasas.

7. La existencia de anticuerpos frente a brucelas lisas en numerosos perros de caza analizados, sugiere que estos animales podrían infectarse por *B. suis* biovar 2, debido al consumo de despojos de jabalíes infectados. Estudios adicionales deben ser realizados para determinar con suficiente precisión si la infección por *B. suis* biovar 2 puede afectar a los perros de caza en Aragón.

RESUMEN

7.- RESUMEN

El objetivo de este trabajo ha consistido en definir la distribución espacial y temporal en Aragón de la infección por *Brucella suis* en el jabalí, así como determinar si la liebre (tanto europea como ibérica), puede intervenir en la epidemiología de la infección. Además, se ha tratado de determinar si esta infección afecta también a los perros de caza que intervienen en las cacerías. El periodo de estudio ha comprendido desde el 1 de septiembre del 2008 hasta el 31 de agosto del 2012, habiéndose analizado un total de 1.949 muestras de jabalí (1.936 de animales cazados y 13 de animales encontrados muertos), procedentes de 32 de las 33 comarcas aragonesas. Un total de 282 muestras de liebre, tanto ibérica *Lepus granatensis* (n= 247) como europea *Lepus europaeus* (n= 35), fueron analizadas. Finalmente se analizaron muestras de 575 perros de caza de diferentes localidades de Aragón.

La determinación de la seroprevalencia de brucelosis en el jabalí fue realizada mediante un ELISA indirecto validado para detectar anticuerpos frente a *Brucella* spp. en ungulados silvestres. Un total de 341 de los 1.569 sueros de jabalí analizados resultaron positivos en el iELISA, obteniendo una seroprevalencia del 21,73% (IC 95%: 19,76-23,84). Muestras de los jabalíes seropositivos se sometieron a cultivo bacteriológico en los casos en los que se dispuso de ellas (n=329). Para el estudio bacteriológico se utilizó una combinación de los medios CITA y Farrell. Un total de 107 jabalíes fueron encontrados infectados y las cepas aisladas fueron todas ellas identificadas mediante métodos convencionales y moleculares como *B. suis* biovar 2. La bacteria se aisló en 28 comarcas, demostrándose su amplia distribución en Aragón. Los tejidos utilizados para el aislamiento de *B. suis* biovar 2 fueron linfonodos y bazo. Muestras de ADN de todas las cepas aisladas fueron analizadas mediante PCR multiplex y PCR-RFLP de los genes *Omp2a*, *Omp2b* y *Omp31* para identificar los posibles haplotipos de *B. suis* biovar 2 existentes. De las 107 cepas aisladas, un total de 90 correspondieron al haplotipo centroeuropeo, mientras que tan solo 17 correspondieron al haplotipo ibérico mayoritario. El haplotipo centroeuropeo se aisló en todas las comarcas en las que hubo aislamiento de *B. suis*, mientras que la presencia del haplotipo ibérico quedó circunscrita a tan solo 7 comarcas, en las que, además, hubo siempre una co-existencia de los dos

haplotipos. Dos de los jabalíes con cultivo positivo presentaron lesiones testiculares asociadas a la infección por *B. suis* biovar 2.

Para realizar el estudio serológico en liebres fue preciso poner a punto un iELISA indirecto con LPS-S de *B. melitensis* 16M como antígeno y usando proteína A como conjugado. Como sueros control para la puesta a punto de dicho ELISA se utilizó los obtenidos de liebres europeas hiper-inmunizadas con bacterias completas de *B. suis* biovar 2 inactivadas, así como los de liebres europeas libres de infección. Todos los sueros de liebres de campo recogidos en nuestro estudio resultaron negativos. Para confirmar la validez de estos resultados serológicos, muestras de liebre de las diferentes comarcas fueron sometidas a estudio bacteriológico utilizando los mismos medios de cultivo que en el caso del jabalí. Todos los cultivos realizados tanto de liebres europeas como de liebres ibéricas resultaron negativos.

Los sueros de perros se analizaron mediante la técnica de rosa de Bengala modificado. Un total de 43 (7,48%; IC 95%: 5,60-9,92) resultaron positivos en dicha técnica. Por otra parte, 16 de estos 43 sueros resultaron positivos también en la prueba de rosa de Bengala estándar, obteniéndose una seroprevalencia del 2,78% (IC 95%: 1,72-4,47) con dicha técnica. Ninguno de los perros sometidos a estudio serológico presentó signos clínicos compatibles con brucelosis. Tan solo se pudo realizar un estudio bacteriológico (hemocultivo) a 4 de los perros positivos en ambas pruebas, resultando todos ellos negativos.

Nuestros resultados confirman una elevada seroprevalencia de brucelosis y una amplia distribución de la infección por *B. suis* biovar 2 en jabalíes en Aragón. La ausencia de casos seropositivos en las muestras de liebre analizadas sugiere el escaso papel que esta especie desempeña en la epidemiología de la infección por *B. suis* en Aragón. La seroprevalencia de brucelosis encontrada en perros de caza es muy difícil de interpretar y valorar debido al escaso número de animales que pudieron ser sometidos a estudio bacteriológico.

SUMMARY

8.- SUMMARY

The aim of this work has been to determine the spatial-temporal distribution of the *Brucella suis* infection in Aragon hosted by wild boars. Also, which role is playing both Iberian and European hares in the epidemiology of the infection has been addressed. Moreover, the study discuss whether hunter dogs are involved in the different outbreaks and if they could be affected or not by the disease. The analysis time of the present study ranges from September 2008 to August 2012, with an extensive sampling programme of 1.949 (1.936 from hunted and 13 from found dead wild boar) and covering 32 of 33 Aragonian Counties. In regard to hares, a total of 282 samples, both Iberian *Lepus granatensis* (n= 247) and European *Lepus europaeus* (n=35) were analysed too. Finally, 575 samples from hunter dogs were also analysed from several Aragonian Counties.

An indirect enzyme immunoassay (iELISA) was used to determine the brucellosis seroprevalence in wild boars and detect antibodies against to *Brucella* spp. Among 1.569 iELISA analyses in wild boars, 341 were positive with a seroprevalence of 21.73% (IC 95%: 19.76-23.84). When samples available (n=329) from positive wild boars bacterial culture tests were made by means of CITA and Farrell. A total of 107 wild boars were found infected and isolated bacterial strains identified by conventional and molecular methods such as *B. suis* biovar 2. The bacterium was found in 28 counties, showing its broad distribution in Aragon. The tissues used in bacteriological analysis in wild boars were lymph nodes and spleen. DNA samples from all isolated strains were analysed by means of PCR multiplex and PCR-RFLP of *Omp2a*, *Omp2b* and *Omp31* genes in order to identify the possible presence of haplotypes of *B. suis* biovar 2. One hundred and seven strains were isolated; being 90 strains of the Central European haplotype, whereas 17 belonged to the Iberian haplotype. The Central European haplotype was detected in all counties with *B. suis*, while the Iberian haplotype was noticed in seven counties and always in coexistence of both haplotypes. Two positive culture wild boars revealed testicular gross lesions by *B. suis* biovar 2.

The serological survey in hares required an indirect iELISA with *B. melitensis* 16M LPS-S as antigen using A-protein as conjugate. Both sera from hares free of haemolysis with completed inactive bacteria of *B. suis* biovar 2 and infection-free European hares were used to set up those iELISA analyses. All tissue samples from collected hares were

negative in the bacteriological analysis. In order to validate this serological survey, the same bacteriological culture was used in hares and wild boar samples as well. All tissue samples from both European and Iberian hares were negative in the bacteriological analysis.

Sera from dogs were tested using the modified Rose Bengal Test (RBT) being 43 positive (7,48%; IC 95%: 5,60-9,92). Moreover, 16 were positive out of those 43 using the standard Rose Bengal Test (RBT), obtaining seroprevalences of 2,78% (IC 95%: 1,72-4,47). None of those dogs showed clinical evidences related to brucellosis. Only four positive dogs from Rose Bengal Tests were submitted to bacterial culture test giving rise negative results.

These results confirm a high prevalence of brucellosis and a broad *B. suis* biovar 2 infection in wild boars in Aragon. The lack of seropositive cases in hares suggests the weak role of hares in the epidemiology of *B. suis* biovar 2 infection in Aragon. The relatively high seroprevalence of brucellosis found in hunting dogs is hard to interpret and assess given the scarce number of dogs included in this survey.

BIBLIOGRAFÍA

9.- BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, B. & Agab, H.** (2002). A review of camel brucellosis. *Preventive Veterinary Medicine*, **55**:47-56.
- Abril, C.; Thomann, A.; Brodard, I.; Wu, N.; Ryser-Degiorgis, M.P.; Frey, J. & Overesch, G.** (2011). A novel isolation method of *Brucella* species and molecular tracking of *Brucella suis* biovar 2 in domestic and wild animals. *Veterinary Microbiology*, **150**:405-410.
- Acevedo, P.; Delibes-Mateos, M.; Escudero, M.A.; Vicente, J.; Marco, J. & Gortázar, C.** (2005). Environmental constraints in the colonization sequence of roe deer (*Capreolus capreolus* Linnaeus, 1758) across the Iberian Mountains, Spain. *Journal of Biogeography*, **32**:1671-1680.
- Acevedo, P.; Escudero, M.A.; Muñoz, R. & Gortázar, C.** (2006). Factors affecting wild boar abundance across an environmental gradient in Spain. *Acta Theriologica*, **51**:327-336.
- Acha, P.N. & Szyfres, B.** (2001). Bacteriosis y Micosis: Brucelosis. En: Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Organización Panamericana de la Salud, Washington. Pp:28-56.
- Adone, R. & Pasquali, P.** (2013). Epidemiosurveillance of brucellosis. *Revue Scientifique et Technique de L'Office International des Epizooties*, **32**:199-205.
- Aguirre, A.A.; McLean, R.G.; Cook, R.S. & Quan, T.J.** (1992). Serologic survey for selected arboviruses and other potential pathogens in wildlife from Mexico. *Journal of Wildlife Diseases*, **28**:435-442.
- Akhtardanesh, B.; Ghanbarpour, R.; Babaei, H. & Nazeri, M.** (2011). Serological evidences of canine brucellosis as a new emerging disease in Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, **1**:177-180.
- Alba, P.; Terracciano, G.; Franco, A.; Lorenzetti, S.; Cocumelli, C.; Fichi, G.; Eleni, C.; Zygmunt, M.S.; Cloeckaert, A. & Battisti, A.** (2013). The presence of *Brucella ceti* ST26 in a striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) with meningoencephalitis from the Mediterranean Sea. *Veterinary Microbiology*, **164**:158-163.
- Al Dahouk, S.; Nöckler, K.; Tomaso, H.; Splettstoesser, W.D.; Jungersen, G.; Riber, U.; Petry, T.; Hoffmann, D.; Scholz, H.C.; Hensel, A. & Neubauer, H.** (2005a).

- Seroprevalence of brucellosis, tularemia, and yersiniosis in wild boars (*Sus scrofa*) from north-eastern Germany. *Journal of Veterinary Medicine*, **52**:444-455.
- Al Dahouk, S.; Tomaso, H.; Prenger-Berninghoff, E.; Splettstoesser, W.D.; Scholz, H.C. & Neubauer, H.** (2005b). Identification of *Brucella* species and biotypes using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *Critical Reviews in Microbiology*, **31**:191-196.
- Alexander, K.A.; Blackburn, J.K.; Vandewalle, M.E.; Pesapane, R.; Baipoledi, E.K. & Elzer, P.H.** (2012). Buffalo, bush meat, and the zoonotic threat of brucellosis in Botswana. *PLoS One*, **7**:e32842.
- Algers, B.; Blokhuis, H.J.; Bøtner, A.; Broom, D.M.; Costa, P.; Domingo, M.; Greiner, M.; Hartung, J.; Koenen, F.; Müller-Graf, C.; Mohan, R.; Morton, D.B.; Osterhaus, A.; Pfeiffer, D.U.; Roberts, R.; Sanaa, M.; Salman, M.; Sharp, J.M.; Vannier, P. & Wierup, M.** (2009). Scientific opinion of the panel on animal health and welfare (AHAW) on a request from the commission on porcine brucellosis (*Brucella suis*). *EFSA Journal*, **1144**:1-112.
- Almeida, A.C.; Santorelli, A.; Bruzadelli, R.M.Z. & Oliveira, M.M.N.F.** (2004). Seroepidemiology of canine brucellosis caused by *Brucella canis* and *Brucella abortus* in Alfenas, MG, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, **56**:275-276.
- Alonso-Urmeneta, B.; Marín, C.; Aragón, V.; Blasco, J.M.; Díaz, R. & Moriyón, I.** (1998). Evaluation of lipopolysaccharides and polysaccharides of different epitopic structures in the indirect enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of brucellosis in small ruminants and cattle. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **5**:749-754.
- Alton, G.G.** (1990). *Brucella suis*. En: Animal Brucellosis. Eds.: Nielsen, K. & Duncan, J.R. CRC Press. Boston. Pp:411-422.
- Alton, G.G.; Jones, L.M.; Angus, R.D. & Verger, J.M.** (1988). Techniques for the Brucellosis Laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique. Paris. Pp:190.
- Alzaga, V.** (2010). Ecología de la parasitación de las liebres (*lepus spp.*) de la península ibérica. Tesis doctoral. Universidad de Castilla-La Mancha. Pp:287.
- Amin, A.S.; Hamdy, M.E. & Ibrahim, A.K.** (2001). Detection of *Brucella melitensis* in semen using the polymerase chain reaction assay. *Veterinary Microbiology*, **83**:37-44.

- Angus, R.D. & Barton, C.E.** (1984). The production and evaluation of a buffered plate antigen for use in the presumptive test for brucellosis. *Developments in biological Standardization*, **56**:349-358.
- Antunes, J.M.A.P.; Machado, G.P.; Costa, L.F.; Fornazari, F.; Cipriano, J.R.B.; Appolinário, C.M.; Allendorf, S.D.; Bagagli, E.; Teixeira, C.R. & Megid, J.** (2010). Comparison of infection by *Brucella* spp. in free-ranging and captive wild animals from São Paulo State, Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, **16**:654-658.
- Apollonio, M.; Anderson, R. & Putman, R.** (2010). European Ungulates and their Management in the 21st Century. *Cambridge University Press*. Pp:618.
- Aragón, V.; Díaz, R.; Moreno, E. & Moriyón, I.** (1996). Characterization of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* native haptens as outer membrane O-type polysaccharides independent from the smooth lipopolysaccharide. *Journal of Bacteriology*, **178**:1070-1079.
- Arnal, M.C.** (2011). Estudio sanitario del sarrío *Rupicapra pirenaica pirenaica* en el Pirineo aragonés. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza. Pp:222.
- Azorit, C. & Moro, J.** (2010). Jabalí (*Sus scrofa* Linnaeus, 1758). En: Ungulados silvestres de España: biología y tecnologías reproductivas para su conservación y aprovechamiento cinegético. Coordinadores: Santiago Moreno, J. & López Sebastián, A. Monografías I.N.I.A. Serie Medioambiental nº2-2010.
- Baddour, M.M. & Alkhalifa, D.H.** (2008). Evaluation of three polymerase chain reaction techniques for detection of *Brucella* DNA in peripheral human blood. *Canadian Journal of Microbiology*, **54**:352-357.
- Baek, B.K.; Lim, C.W.; Rahman, M.S.; Kim, C.H.; Oluoch, A. & Kakoma, I.** (2003). *Brucella abortus* infection in indigenous Korean dogs. *Canadian Journal of Veterinary Research*, **67**:312-314.
- Bailey, K.M.** (1997). Naturally acquired *Brucella ovis* infection in a deer. *Surveillance*, **24**:10-11.
- Baldone, V.N.; Fuchs, L.I.; Fort, M.C.; Rojas, M.C.; Bedotti, D.O.; Samartino, L.; Giménez, H.D. & Kin, M.S.** (2004). Detección serológica de anticuerpos contra *Brucella* en la liebre europea (*Iepus europaeus*, Pallas 1778) en la provincia de la Pampa (Argentina). *Revista de Medicina Veterinaria (Buenos Aires)*, **88**:242-245.
- Ballesteros, F.; Benito, J.L. & González-Quirós, P.** (1996). Situación de las poblaciones de liebres en el norte de la península ibérica. *Quercus*, **128**:12-17.

- Bancroft, J.D. & Gamble, M.** (2008). *Theory and Practice of Histological Techniques*. 6th Edition. Churchill Livingstone, Elsevier.
- Barr, S.C.; Eilts, B.E.; Roy, A.F. & Miller, R.** (1986). *Brucella suis* biotype 1 infection in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **189**:686-687.
- Bártová, E.; Sedlák, K.; Treml, F.; Holko, I. & Literák, I.** (2010). *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in European brown hares in the Czech Republic, Slovakia and Austria. *Veterinary Parasitology*, **171**:155-158.
- Baumgarten, D.** (2002). Brucellosis: a short review of the disease situation in Paraguay. *Veterinary Microbiology*, **90**:63-69.
- Becker, H.N.; Belden, R.C.; Breault, T.; Burridge, M.J.; Frankenberger, W.B. & Nicoletti, P.** (1978). Brucellosis in feral swine in Florida. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **173**:1181-1182.
- Bell, L.M.; Hayles, L.B. & Chanda, A.B.** (1977). Serological evidence of *Brucella mellitensis* infection in goats and eland in Zambia. *Veterinary Record*, **101**:306.
- Bello, A.; Marín, C.; Mogollón, P.; Herrera, H.; Pacheco, S.; Rodríguez, M.; Gil, R.; de la Serna, R. & de Salmerón, C.** (1978). Estudios epidemiológicos sobre brucelosis suina, canina y humana en establecimientos agrícolas de Punta Palmita (Venezuela) 1975. *Veterinaria Tropical*, **3**:3-14.
- Bendtsen, H.; Christiansen, M. & Thomsen, A.** (1956). *Brucella suis* infection in hares as the cause of enzootic brucellosis in pigs. *Separatum: Nordisk Veterinärmedicin*, **8**:1-34.
- Bergagna, S.; Zoppi, S.; Ferroglio, E.; Gobetto, M.; Dondo, A.; Di Giannatale, E.; Gennero, M.S. & Grattarola, C.** (2009). Epidemiologic survey for *Brucella suis* biovar 2 in a wild boar (*Sus scrofa*) population in northwest Italy. *Journal of Wildlife Diseases*, **45**:1178-1181.
- Bicknell, S.R.; Bell, R.A. & Richards, P.A.** (1976). *Brucella abortus* in the bitch. *Veterinary Record*, **99**:85-86.
- Blanco, J.C.; Alcántara, M.; Ibáñez, C.; Aguilar, A.; Grau, E.; Moreno, S.; Balbontín, J. Jordán, G. & Villafuerte, R.** (1998). Mamíferos de España, II. Guía de Campo. Planeta. Barcelona. Pp:383.
- Blasco, J.M.** (2011). Patología bacteriana asociada a la reproducción: brucelosis. En: Estrategias de Futuro del Sector Porcino. *VII Congreso de A.V.P.A.* Zaragoza. Del 28 al 29 de Noviembre 2011.
- Blasco, J.M.** (2002). Brucellosis Ovina y Caprina. Monografías Ovis, **82**.

- Blasco, J.M.** (1990). *Brucella ovis*. En: Animal Brucellosis. Eds.: Nielsen, K. & Duncan, J.R. CRC Press. Boston. Pp:351-378.
- Blasco, J.M.; Garin-Bastuji, B.; Marín, C.; Gerbier, G.; Fanlo, J.; Jiménez de Bagüés, M. & Cau, C.** (1994). Efficacy of different Rose Bengal and complement fixation antigens for the diagnosis of *Brucella melitensis* in sheep and goats. *Veterinary Record*, **134**:415-420.
- Boadella, M.; Carta, T.; Oleaga, A.; Pajares, G.; Muñoz, M. & Gortázar, C.** (2010). Serosurvey for selected pathogens in Iberian roe deer. *BMC Veterinary Research*, **6**:51.
- Boer, W.J.; Crawford, R.P.; Hidalgo, R.J. & Robinson, R.M.** (1980). Small mammals and white-tailed deer as possible reservoir hosts of *Brucella abortus* in Texas. *Journal of Wildlife Diseases*, **16**:19-24.
- Boeri, E.; Escobar, G.I.; Ayala, S.M.; Sosa-Estani, S. & Lucero, N.E.** (2008). Brucellosis canina en perros de la ciudad de Buenos Aires. *Medicina (Buenos Aires)*, **68**:291-297.
- Boschioli, M.L.; Foulongne, V. & O'Callaghan, D.** (2001). Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Current Opinion in Microbiology*, **4**:58-64.
- Bourque, M. & Higgins, R.** (1984). Serologic studies on brucellosis, leptospirosis and tularemia in moose (*Alces alces*) in Quebec. *Journal of Wildlife Diseases*, **20**:95-99.
- Bouvier, G.** (1964). Distribution géographique de quelques maladies du gibier et des animaux sauvages de la Suisse. *Bulletin - Office International des Épidémiologies*, **61**:67.
- Brew, S.D.; Perrett, L.L.; Stack, J.A.; MacMillan, A.P. & Staunton, N.J.** (1999). Human exposure to *Brucella* recovered from a sea mammal. *Veterinary Record*, **144**:483.
- Bricker, B.J.** (2002). PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Veterinary Microbiology*, **90**:435-446.
- Bricker, B.J. & Halling, S.M.** (1994). Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, **32**:2660-2666.
- Bricker, B.J. & Halling, S.M.** (1995). Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51. *Journal of Clinical Microbiology*, **33**:1640-1642.
- Candela, M.G.; Serrano, E.; Martínez-Carrasco, C.; Martín-Atance, P.; Cubero, M.J.; Alonso, F. & León, L.** (2009). Coinfection is an important factor in epidemiological studies: the first serosurvey of the aoudad (*Ammotragus lervia*). *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **28**:481-489.

- Cannon, R.M. & Roe, R.T.** (1982). *Livestock Disease Surveys. A Field Manual for Veterinarians.* Bureau of Resource Science, Department of Primary Industry. Australian Government Publishing Service. Canberra. Pp:33.
- Carmichael, L.E.** (1990). *Brucella canis.* En: *Animal Brucellosis.* Eds.: Nielsen, K. & Duncan, J.R. CRC Press. Boston. Pp:335-350.
- Caroff, M.; Bundle, D.R.; Perry, M.B.; Cherwonogrodzky, J.W. & Duncan, J.R.** (1984). Antigenic S-type lipopolysaccharide of *Brucella abortus* 1119-3. *Infection and Immunity*, **46**:384-388.
- Carvajal, A.; Santiago-Moreno, J.; Toledano-Díaz, A.; Pulido Pastor, A. & López-Sebastián, A.** (2007). Estudio sanitario de la cabra montés (*Capra pyrenaica*) de la reserva andaluza de caza de Tejada y Almirajara. *II Congreso Internacional Género Capra en Europa.* Granada, 20-23 de noviembre del 2007. Libro de resúmenes, Pp:58-59.
- Castrucci, G.** (2000). Reproductive diseases: *Brucella melitensis* infection. En: *Diseases of sheep*, 3th Edition. Eds.: Martin, W.B. & Aitken, I.D. Blackwell Science LTD. Pp:114-119.
- Cerri, D.; Ambrogi, C.; Ebani, V.V.; Poli, A.; Cappelli, F.; Cardini, G. & Andreani, E.** (2002). Experimental *Brucella ovis* infection in a mouflon (*Ovis musimon*). *Journal of Wildlife Diseases*, **38**:287-290.
- Chaparro, F.; Lawrence, J.V.; Bengis, R. & Myburgh, J.G.** (1990). A serological survey for brucellosis in buffalo (*Syncerus caffer*) in the Kruger National Park. *Journal of the South African Veterinary Association*, **61**:110-111.
- Cherwonogrodzky, J.W.; Dubray, G.; Moreno, F. & Mayer, H.** (1990). Antigens of *Brucella*. En: *Animal Brucellosis.* Eds.: Nielsen, K. & Duncan, J.R. CRC Press. Boston. Pp:19-64.
- Chiari, M.; Zanoni, M.G.; Alborali, L.; Salogni, C.; Tittarelli, C.; Tagliabue, S.; Fabbi, M.; Capucci, L. & Lavazza, A.** (2009). Application of a surveillance program in wild European Brown Hares (*Lepus europeaus*) in Brescia province, North Italy. *Atti del III Convegno Nazionale di Ecopatologia della Fauna Torino SIEF.* Del 15 al 17 Octubre de 2009.
- Cloekaert, A.; Kerkhofs, P. & Limet, J.N.** (1992). Antibody response to *Brucella* outer membrane proteins in bovine brucellosis: immunoblot analysis and competitive enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, **30**:3168-3174.

- Cloekaert, A.; Verger, J.M.; Grayon, M. & Grépinet, O.** (1995). Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer-membrane proteins of *Brucella*. *Microbiology*, **141**:2111-2121.
- Cloekaert, A.; Verger, J.M.; Grayon, M. & Vizcaíno, N.** (1996). Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*. *FEMS Microbiology letters*, **145**:1-8.
- Closa-Sebastià, F.; Casas-Díaz, E.; Cuenca, R.; Lavín, S.; Mentaberre, G. & Marco, I.** (2010). *Brucella* species antibodies and isolation in wild boar in north-east Spain. *Veterinary Record*, **167**:826-828.
- Cook, D.R. & Kingston, G.C.** (1988). Isolation of *Brucella suis* biotype 1 from a horse. *Australian Veterinary Journal*, **65**:162-163.
- Cook, D.R. & Noble, J.W.** (1984). Isolation of *Brucella suis* from cattle. *Australian Veterinary Journal*, **61**:263-264.
- Corbel, M.J.** (1972). Characterization of antibodies active in the Rose Bengal plate test for bovine brucellosis. *Journal of Hygiene*, **70**:779-795.
- Corbel, M.J.** (1997). Brucellosis: an overview. *Emerging Infectious Diseases*, **3**:213-221.
- Corbel, M.J.** (1985). Recent advances in the study of *Brucella* antigens and their serological cross reactions. *Veterinary Bulletin*, **55**:927.
- Corbel, M.J. & Brinley-Morgan, W.J.** (1984). Genus *Brucella*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1. Eds.: Krieg, N.R. & Holt, J.G. Williams & Wilkins Co. Baltimore. Pp:377-388.
- Corn, J.L.; Lee, R.M.; Erickson, G.A. & Murphy, C.D.** (1987). Serologic survey for evidence of exposure to vesicular stomatitis virus, pseudorabies virus, brucellosis and leptospirosis in collared peccaries from Arizona. *Journal of Wildlife Diseases*, **23**:551-557.
- Cortez, A.; Scarcelli, E.; Soares, R.M.; Heinemann, M.B.; Sakamoto, S.M.; Genovez, M.E.; Ferreira, F. & Richtzenhain, L.J.** (2001). Detection of *Brucella* DNA from aborted bovine fetuses by polymerase chain reaction. *Australian Veterinary Journal*, **79**:500-501.
- Couturier, M.A.J.** (1962). *Le bouquetin des Alpes (Capra aegagrus ibex ibex)*. Ed.: Par l'auteur. Grenoble, Pp: 1565. Citado por Ferroglio *et al.*, 1998.
- Creech, G.T.** (1930). *Brucella abortus* infection in a male bison. *North American Veterinary*, **11**:35-36. Citado por Rhyan, 2000.

- Cross, P.C.; Edwards, W.H.; Scurlock, B.M.; Maichak, E.J. & Rogerson, J.D.** (2007). Effects of management and climate on elk brucellosis in the Greater Yellowstone ecosystem. *Ecological Applications*, **17**:957-964.
- Cubero-Pablo, M.J.; González, M. & León, L.** (2002). Enfermedades infecciosas de las poblaciones de cabra montés en Andalucía. En: Distribución, genética y estatus sanitario de las poblaciones andaluzas de cabra montés. Coordinador: Pérez, J.M. Universidad de Jaén-Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía. Jaén, España, Pp:199-254.
- Cuteri, V.; Diverio, S.; Carnieletto, P.; Turilli, C. & Valente, C.** (1999). Serological survey for antibodies against selected infectious agents among fallow deer (*Dama dama*) in central Italy. *Zentralblatt für Veterinärmedizin*, **46**:545-549.
- Cutler, S.J.; Whatmore, A.M. & Commander, N.J.** (2005). Brucellosis - new aspects of an old disease. *Journal of Applied Microbiology*, **98**:1270-1281.
- Cvetnić, Ž.; Mitak, M.; Ocepek, M.; Lojkic, M.; Terzic, S.; Jemersic, L.; Humski, A.; Habrun, B.; Sostaric, B.; Brstilo, M.; Krt, B. & Garin-Bastuji, B.** (2003). Wild boars (*Sus scrofa*) as reservoirs of *Brucella suis* biovar 2 in Croatia. *Acta Veterinaria Hungarica*, **51**:465-473.
- Cvetnić, Ž.; Spicić, S.; Curic, S.; Jukic, B.; Lojkic, M.; Albert, D.; Thiébaud, M. & Garin-Bastuji, B.** (2005). Isolation of *Brucella suis* biovar 3 from horses in Croatia. *Veterinary Record*, **156**:584-585.
- Cvetnić, Ž.; Spicić, S.; Tončić, J.; Majnarić, D.; Benić, M.; Albert, D.; Thiébaud, M. & Garin-Bastuji, B.** (2009). *Brucella suis* infection in domestic pigs and wild boar in Croatia. *Reveu Scientifique et Technique de L'Office International des Epizooties*, **28**:1057-1067.
- Dauphin, L.A.; Hutchins, R.J.; Bost, L.A. & Bowen, M.D.** (2009). Evaluation of automated and manual commercial DNA extraction methods for recovery of *Brucella* DNA from suspensions and spiked swabs. *Journal of Clinical Microbiology*, **47**:3920-3926.
- Davidson, W.R.; Crum, J.M.; Blue, J.L.; Sharp, D.W. & Phillips, J.H.** (1985). Parasites, diseases, and health status of sympatric populations of fallow deer and white-tailed deer in Kentucky. *Journal of Wildlife Diseases*, **21**:153-159.
- Davies, G.** (1971). The Rose Bengal test. *Veterinary Record*, **88**:447-449.
- Davies, G.; Ockey, J.H. & Lloyd, H.G.** (1973). Isolation of *Brucella abortus* from a fox (*Vulpes vulpes*). *State Veterinary Journal*, **28**:250-252.

- Davis, D.S.** (1990). Brucellosis in Wildlife. En: Animal Brucellosis. Eds.: Nielsen, K. & Duncan, J.R. CRC Press. Boston. Pp:321-334.
- Davis, D.S.; Boeer, W.J.; Mims, J.P.; Heck, F.C. & Adams, L.G.** (1979). *Brucella abortus* in coyotes. I. A serologic and bacteriologic survey in eastern Texas. *Journal of Wildlife Diseases*, **15**:367-372.
- Davis, D.S. & Elzer, P.H.** (2002). *Brucella* vaccines in wildlife. *Veterinary Microbiology*, **90**:533-544.
- Davis, D.S.; Heck, F.C. & Adams, L.G.** (1984). Experimental infection of captive axis deer with *Brucella abortus*. *Journal of Wildlife Diseases*, **20**:177-179.
- Davis, D.S.; Heck, F.C.; Williams, J.D.; Simpson, T.R. & Adams, L.G.** (1988). Interspecific transmission of *Brucella abortus* from experimentally infected coyotes (*Canis latrans*) to parturient cattle. *Journal of Wildlife Diseases*, **24**:533-537.
- Davison, N.J.; Barnett, J.E.; Perrett, L.L.; Dawson, C.E.; Perkins, M.W.; Deaville, R.C. & Jepson, P.D.** (2013). Meningoencephalitis and arthritis associated with *Brucella ceti* in a short-beaked Common Dolphin (*Delphinus delphis*). *Journal of Wildlife Diseases*, **49**:632-636.
- Davison, N.J.; Perrett, L.L.; Law, R.J.; Dawson, C.E.; Stubberfield, E.J.; Monies, R.J.; Deaville, R. & Jepson, P.D.** (2011). Infection with *Brucella ceti* and high levels of polychlorinated biphenyls in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) stranded in south-west England. *Veterinary Record*, **169**:14.
- Dawson, C.E.; Perrett, L.L.; Stubberfield, E.J.; Stack, J.A.; Farrelly, S.S.; Cooley, W.A.; Davison, N.J. & Quinney, S.** (2008). Isolation and characterization of *Brucella* from the lungworms of a harbor porpoise (*Phocoena phocoena*). *Journal of Wildlife Diseases*, **44**:237-246.
- Deem, S.L.; Noss, A.J.; Villarroel, R.; Uhart, M.M. & Karesh, W.B.** (2004). Disease survey of free-ranging grey brocket deer (*Mazama gouazoubira*) in the Gran Chaco, Bolivia. *Journal of Wildlife Diseases*, **40**:92-98.
- De Massis, F.; Di Provvido, A.; Di Sabatino, D.; Di Francesco, D.; Zilli, K.; Ancora, M. & Tittarelli, M.** (2012). Isolation of *Brucella suis* biovar 2 from a wild boar in the Abruzzo Region of Italy. *Veterinaria Italiana*, **48**:397-404.
- 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. *Journal of Clinical Microbiology*, **49**:1458-1463.

- Deqiu, S.; Donglou, X. & Jiming, Y. (2002). Epidemiology and control of brucellosis in China. *Veterinary Microbiology*, **90**:165-182.
- Díaz, R.; Jones, L.M.; Leong, D. & Wilson, J.B. (1968). Surface antigens of smooth *brucellae*. *Journal of Bacteriology*, **96**:893-901.
- Díaz Aparicio, E. (2013). Epidemiology of brucellosis in domestic animals caused by *Brucella melitensis*, *Brucella suis* and *Brucella abortus*. *Revue Scientifique et Technique de L'Office International des Epizooties*, **32**:53-60.
- Dieterich, R.A.; Morton, J.K. & Zarnke., R.L. (1991). Experimental *Brucella suis* biovar 4 infection in a moose. *Journal of Wildlife Diseases*, **27**:470-472.
- Dolan, J.M. (1976). The Arabian oryx (*Oryx leucoryx*): Its destruction, captive history and propagation. *International Zoo Yearbook*, **12**:230-239.
- Douglas, J.T. & Palmer, D.A. (1988). Use of monoclonal antibodies to indentify the distribution of A and M epitopes on smooth *Brucella* species. *Journal of Clinical Microbiology*, **26**:1353-1356.
- Drew, M.L.; Jessup, D.A.; Burr, A.A. & Franti, C.E. (1992). Serologic survey for brucellosis in feral swine, wild ruminants, and black bear of California, 1977 to 1989. *Journal of Wildlife Diseases*, **28**:355-363.
- Dunbar, M.R.; Velarde, R.; Gregg, M.A. & Bray, M. (1999). Health evaluation of a pronghorn antelope population in Oregon. *Journal of Wildlife Diseases*, **35**:496-510.
- Eales, K.M.; Norton, R.E. & Ketheesan, N. (2010). Brucellosis in northern Australia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **83**:876-878.
- Ebani, V.V.; Cerri, D.; Poli, A. & Andreani, E. (2003). Prevalence of *Leptospira* and *Brucella* antibodies in wild boars (*Sus scrofa*) in Tuscany, Italy. *Journal of Wildlife Diseases*, **39**:718-722.
- Edmonds, M.D.; Samartino, L.E.; Hoyt, P.G.; Hagius, S.D.; Walker, J.V.; Enright, F.M.; Schurig, G.G. & Elzer, P. (2001). Oral vaccination of sexually mature pigs with *Brucella abortus* vaccine strain RB51. *American Journal of Veterinary Research*, **62**:1328-1331.
- Eisenberg, T.; Hamann, H.P.; Kaim, U.; Schlez, K.; Seeger, H.; Schauerte, N.; Melzer, F.; Tomaso, H.; Scholz, H.C.; Koylass, M.S.; Whatmore, A.M. & Zschöck, M. (2012). Isolation of potentially novel *Brucella* spp. from frogs. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**:3753-3755.

- Engeman, R.; Betsill, C. & Ray, T.** (2011). Making contact: rooting out the potential for exposure of commercial production swine facilities to feral swine in North Carolina. *EcoHealth*, **8**:76-81.
- Enright, F.M.** (1990). The pathogenesis and pathobiology of *Brucella* infection in domestic animals. En: Animal Brucellosis. Eds.: Nielsen, K. & Duncan, J.R. CRC Press. Boston. Pp:301-320.
- Etter, R.P. & Drew, M.L.** (2006). Brucellosis in elk of eastern Idaho. *Journal of Wildlife Diseases*, **42**:271-278.
- Ewalt, D.R. & Bricker, B.J.** (2003). Identification and differentiation of *Brucella abortus* field and vaccine strains by BaSS-PCR. *Methods in Molecular Biology*, **216**:97-108.
- Ewalt, D.R.; Payeur, J.B.; Rhyan, J.C. & Geer, P.L.** (1997). *Brucella suis* biovar 1 in naturally infected cattle: a bacteriological, serological, and histological study. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **9**:417-420.
- Falconi, C.; Oleaga, A.; López-Olvera, J.R.; Casáis, R.; Prieto, M. & Gortázar, C.** (2010). Prevalence of antibodies against selected agents shared between Cantabrian chamois (*Rupicapra pirenaica parva*) and domestic goats. *European Journal of Wildlife Research*, **56**:319-325.
- Farrell, I.D.** (1974). The development of a new selective medium for the isolation of *B. abortus* from contaminated sources. *Research in Veterinary Science*, **16**:280-286.
- Fekete, A.; Bantle, J.A. & Halling, S.M.** (1992). Detection of *Brucella* by polymerase chain reaction in bovine fetal and maternal tissues. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **4**:79-83.
- Ferguson, M.A.** (1997). Rangiferine brucellosis on Baffin Island. *Journal of Wildlife Diseases*, **33**:536-543.
- Fernández-Llario, P. & Mateos-Quesada, P.** (2005). Influence of rainfall on the breeding biology of wild boar (*Sus scrofa*) in a Mediterranean ecosystem. *Folia Zoologica*, **54**:240-248.
- Ferney, J.** (1987). Le chien, vecteur ou réservoir de l'infection brucellique. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, **40**:331-333.
- Ferrão-Beck, L.; Cardoso, R.; Muñoz, P.M.; de Miguel, M.J.; Albert, D.; Ferreira, A.C.; Marín, C.M.; Thiébaud, M.; Jacques, I.; Grayon, M.; Zygmunt, M.S.; Garin-Bastuji, B.; Blasco, J.M. & Sá, M.I.** (2006). Development of a multiplex PCR assay for polymorphism analysis of *Brucella suis* biovars causing brucellosis in swine. *Veterinary Microbiology*, **115**:269-277.

- Ferroglio, E.; Gennero, M.S.; Pasino, M.; Bergagna, S.; Dondo, A.; Grattarola, C.; Rondoletti, M. & Bassano, B. (2007). Cohabitation of a *Brucella melitensis* infected Alpine ibex (*Capra ibex*) with domestic small ruminants in an enclosure in Gran Paradiso National Park, in Western Italian Alps. *European Journal of Wildlife Research*, **53**:158-160.
- Ferroglio, E.; Gennero, S.; Rossi, L. & Tolari, E. (2003). Monitoraggio di un focolaio di brucellosi nel camoscio alpino. *Journal of Mountain Ecology (Suppl.)* **7**:229-232.
- Ferroglio, E.; Tolari, F.; Bollo, E. & Bassano, B. (1998). Isolation of *Brucella melitensis* from alpine ibex. *Journal of Wildlife Diseases*, **34**:400-402.
- Ficht, T.A.; Bearden, S.W.; Sowa, B.A. & Adams, L.G. (1989). DNA sequence and expression of the 36-kilodalton outer membrane protein gene of *Brucella abortus*. *Infection and Immunity*, **57**:3281-3291.
- Ficht, T.A.; Bearden, S.W.; Sowa, B.A. & Marquis, H. (1990). Genetic variation at the *Omp2* porin locus of the *brucellae*: species-specific markers. *Molecular Microbiology*, **4**:1135-1142.
- Ficht, T.A.; Husseinen, H.S.; Derr, J. & Bearden, S.W. (1996). Species-specific sequences at the *Omp2* locus of *Brucella* type strains. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **46**:329-331.
- Fiori, P.L.; Mastrandrea, S.; Rappelli, P. & Cappuccinelli, P. (2000). *Brucella abortus* infection acquired in microbiology laboratories. *Journal Clinical of Microbiology*, **38**:2005-2006.
- Fischer, D.; Lorenz, N.; Heuser, W.; Kämpfer, P.; Scholz, H.C. & Lierz, M. (2012). Abscesses associated with a *Brucella inopinata*-like bacterium in a big-eyed tree frog (*Leptopelis vermiculatus*). *Journal of Zoo Wildlife Medicine*, **43**:625-628.
- Flores-Castro, R. & Carmichael, L.E. (1977). Canine brucellosis: current status of methods for diagnosis and treatment. *27th Gaines Veterinary Symposium*, 17-24.
- Fogarty, P. (2007). National distribution of feral hogs and related stakeholder attitudes. Tesis Doctoral. Mississippi State University. Pp:88.
- Forbes, L.B. (1990). *Brucella abortus* infection in 14 farm dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **196**:911-916.
- Forbes, L.B. (1991). Isolates of *B. suis* biovar 4 from animals and humans in Canada, 1982-1990. *Canadian Veterinary Journal*, **32**:686-688.
- Forbes L.B.; Nielsen, O.; Measures, L. & Ewalt, D.R. (2000). Brucellosis in ringed seals and harp seals from Canada. *Journal of Wildlife Diseases*, **36**:595-598.

- Forbes, L.B. & Tessaro, S.V.** (2003). Evaluation of cattle for experimental infection with and transmission of *Brucella suis* biovar 4. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **222**:1252-1256.
- Forbes, L.B.; Tessaro, S.V. & Lees, W.** (1996). Experimental studies on *Brucella abortus* in moose (*Alces alces*). *Journal of Wildlife Diseases*, **32**:94-104.
- Foreyt, W.J.; Smith, T.C.; Evermann, J.F. & Heimer, W.E.** (1983). Hematologic, serum chemistry and serologic values of Dall's sheep (*Ovis dalli dalli*) in Alaska. *Journal of Wildlife Diseases*, **19**:136-139.
- Fort, M.; Baldone, V.; Fuchs, L.; Giménez, H.; Rojas, M.; Breccia, J.D. & Oyhenart, J.** (2012). Experimental infection of rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) with *Brucella suis* biovar 1 isolated from wild hares (*Lepus europaeus*). *Veterinary Microbiology*, **156**:392-442.
- Fort, M.C.; Baldone, V.N.; Fuchs, L.I.; Rojas, M.C.; Bedotti, D.O. & Giménez, H.D.** (2006). Aislamiento de *Brucella suis* en liebre europea (*Lepus europaeus*) en la provincia de La Pampa - Argentina. *Boletín de Divulgación Técnica, INTA*, **90**:175-181.
- Foster, G.; MacMillan, A.P.; Godfroid, J.; Howie, F.; Ross, H.M.; Cloeckaert, A.; Reid, R.J.; Brew, S. & Patterson, I.A.P.** (2002). A review of *Brucella* sp. infection of sea mammals with particular emphasis on isolates from Scotland. *Veterinary Microbiology*, **90**:563-580.
- Foster, G.; Osterman, B.S.; Godfroid, J.; Jacques, I. & Cloeckaert, A.** (2007). *Brucella ceti* sp. nov and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **57**:2688-2693.
- Francart, H.; Segart, M.; Verlinde, A.; Castryck, F.; Dekeyser, J. & Vandepitte, J.** (1983). Brucellose humaine à *Brucella suis* biotype 1 en Belgique. *Médecine et Maladies Infectieuses*, **13**:287-289.
- Fredriksson-Ahomaa, M.; Wacheck, S.; Bonke, R. & Stephan, R.** (2011). Different enteropathogenic *Yersinia* strains found in wild boars and domestic pigs. *Foodborne Pathogens and Diseases*, **8**:733-737.
- Fredriksson-Ahomaa, M.; Wacheck, S.; Koenig, M.; Stolle, A. & Stephan, R.** (2009). Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in wild boars in Switzerland. *International Journal of Food Microbiology*, **135**:199-202.

- Fretin, D.; Mori, M.; Czaplicki, G.; Quinet, C.; Maquet, B.; Godfroid, J. & Saegerman, C.** (2013). Unexpected *Brucella suis* biovar 2 infection in a dairy cow, Belgium. *Emerging Infectious Diseases*, **19**:2053-2054.
- Frölich, K.; Wisser, J.; Schmäser, H.; Fehlberg, U.; Neubauer, H.; Grunow, R.; Nikolaou, K.; Priemer, J.; Thiede, S.; Streich, W.J. & Speck, S.** (2003). Epizootiologic and ecologic investigations of European brown hares (*Lepus europaeus*) in selected populations from Schleswig-Holstein, Germany. *Journal of Wildlife Diseases*, **39**:751-761.
- Gabor, T.M.; Hellgren, E.C.; Van Den Bussche, R.A. & Silvy, N.J.** (1999). Demography, sociospatial behaviour and genetics of feral pigs in a semi-arid environment. *Journal of Zoology London*, **247**:311-322.
- Gaffuri, A.; Giacometti, M.; Tranquillo, V.M.; Magnino, S.; Cordioli, P. & Lanfranchi, P.** (2006). Serosurvey of roe deer, chamois and domestic sheep in the central Italian Alps. *Journal of Wildlife Diseases*, **42**:685-690.
- Gall, D.; Nielsen, K.; Forbes, L.; Cook, W.; Leclair, D.; Balsevicius, S.; Kelly, L.; Smith, P. & Mallory, M.** (2001). Evaluation of the fluorescence polarization assay and comparison to other serological assays for detection of brucellosis in cervids. *Journal of Wildlife Diseases*, **37**:110-118.
- Gall, D.; Nielsen, K.; Forbes, L.; Davis, D.; Elzer, P.; Olsen, S.; Balsevicius, S.; Kelly, L.; Smith, P.; Tan, S. & Joly, D.** (2000). Validation of the fluorescence polarization assay and comparison to other serological assays for the detection of serum antibodies to *Brucella abortus* in bison. *Journal of Wildlife Diseases*, **36**:469-476.
- García-Carrillo, C.** (1990). Laboratory animal models for brucellosis studies. En: Animal Brucellosis. Eds.: Nielsen, K. & Duncan, J.R. CRC Press. Boston. Pp:423-442.
- García-Moreno, A.M.; Vega, F.G.; Moreno, A.M.; Gragera-Slikker, A. & Habela, M.A.** (2009). Vigilancia epidemiológica de procesos infectocontagiosos en la cabra montés (*Capra pyrenaica victoriae*) en Cáceres (Extremadura, España). V *World Conference on Mountain Ungulates*. Granada, 10-14 de noviembre de 2009. Book of abstracts, p:257.
- García-Yoldi, D.; Le Fleche, P.; de Miguel, M.J.; Muñoz, P.M.; Blasco, J.M.; Cvetnić, Ž.; Marín, C.M.; Vergnaud, G. & López-Goñi, I.** (2007). Comparison of multiplelocus variable-number tandem-repeat analysis with other PCR-based methods for typing *Brucella suis* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, **45**:4070-4072.

- García-Yoldi, D.; Marín, C.M.; de Miguel, M.J.; Muñoz, P.M.; Vizmanos, J.L. & López-Goñi, I.** (2006). Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all *Brucella* species and the vaccine strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis* Rev1. *Clinical Chemistry*, **52**:779-781.
- García-Yoldi, D.; Marín, C.M. & López-Goñi, I.** (2005). Restriction site polymorphisms in the genes encoding new members of group 3 outer membrane protein family of *Brucella* spp. *FEMS Microbiology Letters*, **245**:79-84.
- Gardner, I.A.; Hietala, S. & Boyce, W.M.** (1996). Validity of using serological tests for diagnosis of diseases in wild animals. *Revue Scientifique et Technique de L'Office International des Epizooties*, **15**:323-335.
- Garin-Bastuji, B. & Blasco, J.M.** (1997). Caprine and ovine brucellosis (excluding *Brucella ovis* infection). En: Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, 3th Edition. Ed.: Office International des Epizooties. Paris. France. Pp:350-362.
- Garin-Bastuji, B. & Delcueillette, F.** (2001). Human and animal brucellosis in France in 2000. Epidemiological situation - Control and eradication programmes. Les brucelloses humaine et animale en France en l'an 2000. Situation épidémiologique - Programmes de contrôle et d'éradication, **31**:202-216.
- Garin-Bastuji, B.; Hars, J.; Calvez, D.; Thiébaud, M. & Artois, M.** (2000). Brucellose du porc domestique et du sanglier sauvage due à *Brucella suis* biovar 2 en France. *Epidémiologie et Santé Animale*, **38**:1-5.
- Garin-Bastuji, B.; Oudar, J.; Richard, Y. & Gastellu, J.** (1990). Isolation of *Brucella melitensis* biovar 3 from a chamois (*Rupicapra rupicapra*) in the southern French Alps. *Journal of Wildlife Diseases*, **26**:116-118.
- Garin-Bastuji, B.; Vaillant, V.; Albert, D.; Tourrand, B.; Danjean, M.P.; Lagier, A.; Rispal, P.; Benquet, B.; Maurin, M.; De Valk, H. & Mailles, A.** (2006). Is brucellosis due the biovar 2 of *Brucella suis* an emerging zoonosis in France? Two case reports in wild boar and hare hunters. *Proceedings of the International Society of Chemotherapy Disease Management Meeting, 1st International Meeting on Treatment of Human Brucellosis*. Ioannina, Greece. Pp:7-10.
- Gates, C.C.; Wobeser, G. & Forbes, L.B.** (1984). Rangiferine brucellosis in a Muskox, *Ovibos moschatus moschatus* (Zimmermann). *Journal of Wildlife Diseases*, **20**:233-234.
- Gennero, M.S.; Grattarola, C.; Bergagna, S.; Zoppi, S.; Barbaro, A. & Dondo, A.** (2006). Trend of *Brucella suis* infection in wild boar in piedmont region (2002-2005). *Epidémiologie et Santé Animale*, **49**:59-62.

- Gentile, L.; Mari, F.; Cardeti, G. & Mari, G.** (2000). Serologic survey in a chamois population of Abruzzo. *Hystrix-Italian Journal of Mammalogy*, **11**:115-119.
- Gerbier, G.; Garin-Bastuji, B.; Pouillot, R.; Very, P.; Cau, C.; Berr, V.; Dufour, B. & Moutou, F.** (1997). False positive serological reactions in bovine brucellosis: evidence of the role of *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 in a field trial. *Veterinary Research*, **28**:375-383.
- Gese, E.M.; Schultz, R.D.; Johnson, M.R.; Williams, E.S.; Crabtree, R.L. & Ruff, R.L.** (1997). Serological survey for diseases in free-ranging coyotes (*Canis latrans*) in Yellowstone National Park, Wyoming. *Journal of Wildlife Diseases*, **33**:47-56.
- Giacometti, M.; Roganti, R.; De Tann, D.; Stahlberger-Saitbekova, N. & Obexer-Ruff, G.** (2004). Alpine ibex *Capra ibex ibex* x domestic goat *C. aegagrus domestica* hybrids in a restricted area of southern Switzerland. *Wildlife Biology*, **10**:137-143.
- Giacometti, M.; Tolari, F.; Mannelli, A. & Lanfranchi, P.** (1995). Seroepidemiologic investigations in the Alpine ibex (*Capra ibex ibex*) of Piz Albris in the canton of Grigioni (Switzerland). *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, **137**:537-542.
- Gibert, P.** (2004). Le suivi sanitaire des isards des Pyrénées françaises. Le réseau d'épidémiologie-surveillance SAGIR et la Réserve Nationale de Chasse et de Faune Sauvage d'Orlu (Ariège). En: El Sarrío Pirenaico Rupicapra p. pirenaica: Biología, Patología y Gestión. Eds.: Herrero, J.; Escudero, E.; Fernández de Luco, D.; García-González, R., Publicaciones del Consejo de Protección de la Naturaleza de Aragón y de la Fundación para el Estudio y Defensa de la Naturaleza y la Caza, Zaragoza. Serie de Investigación, 46. Pp:103-116.
- Giovannini, A.; Cancellotti, F.M.; Turilli, C. & Randi, E.** (1988). Serological investigations for some bacterial and viral pathogens in fallow deer (*Cervus dama*) and wild boar (*Sus scrofa*) of the San Rossore Preserve, Tuscany, Italy. *Journal of Wildlife Diseases*, **24**:127-132.
- Giurgiutiu, D.; Banis, C.; Hunt, E.; Mincer, J.; Nicolardi, C.; Weltman, A.; Stanek, D.; Matthews, S.; Siegenthaler, C.; Blackmore, C.; Tiller, R.; De, B. & Stauffer, K.** (2009). *Brucella suis* infection associated with feral swine hunting—three states, 2007–2008. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, **58**:618-621.
- Godfroid, J.** (2002). Brucellosis in wildlife. *Revue Scientifique et Technique de L'Office International des Epizooties*, **21**:277–286.
- Godfroid, J.; Cloeckart, A.; Liautard, J.P.; Kohler, S.; Fretin, D.; Walravens, K.; Garin-Bastuji, B. & Letesson, J.J.** (2005). From the discovery of the Malta fever's agent to

- the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Veterinary Research*, **36**:313-326.
- Godfroid, J.; Garin-Bastuji, B.; Saegerman, C. & Blasco, J.M.** (2013). Brucellosis in terrestrial wildlife. *Revue Scientifique et Technique de L'Office International des Epizooties*, **32**:27-42.
- Godfroid, J. & Käsbohrer, A.** (2002). Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty-first century. *Veterinary Microbiology*, **90**:135-145.
- Godfroid, J.; Michel, P.; Uytterhaegen, L.; Desmedt, C.; Rasseneur, F.; Boelaert, F.; Saegerman, C. & Patigny, X.** (1994). *Brucella suis* biotype 2 infection of wild boars (*Sus scrofa*) in Belgium. *Annales de Médecine Vétérinaire*, **138**:263-268.
- Godfroid, J.; Nielsen, K. & Saegerman, C.** (2010). Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. *Croatian Medical Journal*, **51**:296-305.
- Godfroid, J.; Scholz, H.C.; Barbier, T.; Nicolas, C.; Wattiau, P.; Fretin, D.; Whatmore, A.M.; Cloeckart, A.; Blasco, J.M.; Moriyón, I.; Saegerman, C.; Muma, J.B.; Al Dahouk, S.; Neubauer, H. & Letesson, J.J.** (2011). Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century. *Preventive Veterinary Medicine*, **102**:118-131.
- González-Barrientos, R.; Morales, J.A.; Hernández-Mora, G.; Barquero-Calvo, E.; Guzmán-Verri, C.; Chaves-Olarte, E. & Moreno, E.** (2010). Pathology of striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) infected with *Brucella ceti*. *Journal of Comparative pathology*, **142**:347-352.
- Gortázar, C.; Acevedo, P.; Ruiz-Fons, F. & Vicente, J.** (2006). Disease risks and overabundance of game species. *European Journal of Wildlife Research*, **52**:81-87.
- Gortázar, C.; Ferroglio, E.; Höfle, U.; Frölich, K. & Vicente, J.** (2007a). Diseases shared between wildlife and livestock: a European perspective. *European Journal of Wildlife Research*, **53**:241-256.
- Gortázar, C.; Herrero, J.; Villafuerte, R. & Marco, J.** (2000). Historical examination of the status of mammals in Aragon, Spain. *Mammalia*, **64**:411-422.
- Gortázar, C.; Millán, J.; Acevedo, P.; Escudero, M.A.; Marco, J. & Fernández de Luco, D.** (2007b). A large-scale survey of Brown hare *Lepus europaeus* and Iberian hare *L. granatensis* populations at the limit of their ranges. *Wildlife Biology*, **13**:244-250.
- Gourreau, J.D.; Garin-Bastuji, B.; Simon, A.; Sarrazin, C. & Oudar, J.** (1993) A serological survey on the health status of large ungulates in the central and

- southern French Alps. *Revue Scientifique et Technique de L'Office International des Epizooties*, **12**:151-156.
- Gradwell, D.V.; Schutte, A.P.; van Niekerk, C.A. & Roux, D.J.** (1977). The isolation of *Brucella abortus* biotype I from African buffalo in the Kruger National Park. *Journal of the South African Veterinary Association*, **48**:41-43.
- Granados, J.E.; Pérez, J.M.; Márquez, F.J.; Serrano, E.; Soriguer, R.C. & Fandos, P.** (2001). La cabra montés (*Capra pyrenaica*, SCHINZ 1838). *Galemys*, **13**:3-37.
- Grégoire, F.; Mousset, B.; Hanrez, D.; Michaux, C.; Walravens, K. & Linden, A.** (2012). A serological and bacteriological survey of brucellosis in wild boar (*Sus scrofa*) in Belgium. *BMC Veterinary Research*, **8**:80.
- Greiner, M.; Verloo, D. & De Massis, F.** (2009). Meta-analytical equivalence studies on diagnostic tests for bovine brucellosis allowing assessment of a test against a group of comparative tests. *Preventive Veterinary Medicine*, **92**:373-381.
- Gresham, C.S.; Gresham, C.A.; Duffy, M.J.; Faulkner, C.T. & Patton, S.** (2002). Increased prevalence of *Brucella suis* and pseudorabies virus antibodies in adults of an isolated feral swine population in coastal South Carolina. *Journal of Wildlife Diseases*, **38**:653-656.
- Greth, A.; Calvez, D.; Vassart, M. & Lefèvre, P.C.** (1992). Serological survey for bovine bacterial and viral pathogens in captive Arabian oryx (*Oryx leucoryx* Pallas, 1776). *Revue Scientifique et Technique de L'Office International des Epizooties*, **11**:1163-1168.
- Grocock, C.M. & Staak, C.** (1969). The isolation of *Brucella abortus* from a waterbuck (*Kobus ellipsiprymnus*). *Veterinary Record*, **85**:318.
- Gruver, K.S. & Guthrie, J.W.** (1996). Parasites and selected diseases of collared peccaries (*Tayassu tajacu*) in the trans-pecos region of Texas. *Journal of Wildlife Diseases*, **32**:560-562.
- Gustafsson, K. & Ugglå, A.** (1994). Serologic survey for *Toxoplasma gondii* infection in the brown hare (*Lepus europaeus* P.) in Sweden. *Journal of Wildlife Diseases*, **30**:201-204.
- Guzmán-Verri, C.; González-Barrientos, R.; Hernández-Mora, G.; Morales, J.A.; Baquero-Calvo, E.; Chaves-Olarte, E. & Moreno, E.** (2012). *Brucella ceti* and brucellosis in cetaceans. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **2**:3.
- Gwida, M.; El-Gohary, A.; Melzer, F.; Khan, I.; Rösler, U. & Neubauer, H.** (2012). Brucellosis in camels. *Research in Veterinary Science*, **92**:351-355.

- Gyuranecz, M.; Erdélyi, K.; Makrai, L.; Fodor, L.; Szépe, B.; Raczné Mészáros, Á.; Dán, A.; Dencso, L.; Fassang, E. & Szeredi, L. (2011). Brucellosis of the European brown hare (*Lepus europaeus*). *Journal of Comparative Pathology*, **145**:1-5.
- Gyuranecz, M.; Szeredi, L.; Makrai, L.; Fodor, L.; Mészáros, Á.R.; Szépe, B.; Füleki, M. & Erdélyi, K. (2010). Tularemia of European Brown Hare (*Lepus europaeus*): a pathological, histopathological, and immunohistochemical study. *Veterinary Pathology*, **47**:958-963.
- Halling, S.M.; Peterson-Burch, B.D.; Bricker, B.J.; Zuerner, R.L.; Qing, Z.; Li, L.L.; Kapur, V.; Alt, D.P. & Olsen, S.C. (2005). Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *Journal of Bacteriology*, **187**:2715-2726.
- Hampy, B.; Pence, D.B. & Simpson, C.D. (1979). Serological studies on sympatric Barbary sheep and mule deer from Palo Duro Canyon, Texas. *Journal of Wildlife Diseases*, **15**:443-446.
- Her, M.; Cho, D.H.; Kang, S.I.; Lim, J.S.; Kim, H.J.; Cho, Y.S.; Hwang, I.Y.; Lee, T.; Jung, S.C. & Yoo, H.S. (2010). Outbreak of brucellosis in domestic elk in Korea. *Zoonoses and Public Health*, **57**:155-161.
- Hernández-Mora, G.; González-Barrientos, R.; Morales, J.A.; Chaves-Olarte, E.; Guzmán-Verri, C.; Barquero-Calvo, E.; de Miguel, M.J.; Marín, C.M.; Blasco, J.M. & Moreno, E. (2008). Neurobrucellosis in stranded dolphins, Costa Rica. *Emerging Infectious Diseases*, **14**:1430-1433.
- Hernández-Mora, G.; Palacios-Alfaro, J.D. & González-Barrientos, R. (2013). Wildlife reservoirs of brucellosis: *Brucella* in aquatic environments. *Revue Scientifique et Technique de L'Office International des Epizooties*, **32**:89-103.
- Herrero, J. (2002). Adaptación funcional del jabalí *Sus scrofa* L. aun ecosistema forestal y a un sistema agrario intensivo en Aragón. Publicaciones del Consejo de Protección de la Naturaleza de Aragón. Pp:159.
- Herrero, J.; García-Serrano, A.; Couto, S.; Ortuño, V.M. & García-González, R. (2006). Diet of wild boar *Sus scrofa* L. and crop damage in an intensive agroecosystem. *European Journal of Wildlife Research*, **52**:245-250.
- Hinić, V.; Brodard, I.; Petridou, E.; Filioussis, G.; Contos, V.; Frey, J. & Abril, C. (2010). Brucellosis in a dog caused by *Brucella melitensis* Rev 1. *Veterinary Microbiology*, **141**:391-392.

- Hinić, V.; Brodard, I.; Thomann, A.; Holub, M.; Miserez, R. & Abril, C. (2009). IS711-based real-time PCR assay as a tool for detection of *Brucella* spp. in wild boars and comparison with bacterial isolation and serology. *BMC Veterinary Research*, **5**:22.
- Höflechner-Pörtl, A.; Hofer, E.; Awad-masalmeh, M.; Müller, M. & Steineck, T. (2000). Tularämie und Brucellose bei Feldhasen und Füchsen in Österreich. *Tierärztl Umschau*, **55**:264-268.
- Hollett, R.B. (2006). Canine brucellosis: Outbreaks and compliance. *Theriogenology*, **66**:575-587.
- Hotta, A.; Tanabayashi, K.; Yamamoto, Y.; Fujita, O.; Uda, A.; Mizoguchi, T. & Yamada, A. (2012). Seroprevalence of tularemia in wild bears and hares in Japan. *Zoonoses and Public Health*, **59**:89-95.
- Hubálek, Z.; Juřicová, Z.; Svobodová, S. & Halouzka, J. (1993). A serologic survey for some bacterial and viral zoonoses in game animals in the Czech Republic. *Journal of Wildlife Diseases*, **29**:604-607.
- Hubálek, Z.; Tremel, F.; Juřicová, Z.; Huňady, M.; Halouzka, J.; Janík, V. & Bill, D. (2002). Serological survey of the wild boar (*Sus scrofa*) for tularaemia and brucellosis in South Moravia, Czech Republic. *Veterinární Medicína*, **47**:60-66.
- Hubálek, Z.; Scholz, H.C.; Sedlacek, I.; Melzer, F.; Sanogo, Y.O. & Nesvadbova, J. (2007). Brucellosis of the common vole (*Microtus arvalis*). *Vector-Borne Zoonotic Diseases*, **7**:679-687.
- Hudson, M.; Child, K.N.; Hatler, D.F.; Fujino, K.K. & Hodson, K.A. (1980). Brucellosis in moose (*Alces alces*) a serological survey in an open range cattle area of north central British Columbia recently infected with bovine brucellosis. *Canadian Veterinary Journal*, **21**:47-49.
- Hueffer, K.; Gende, S.M. & O'Hara, T.M. (2013). Assay dependence of *Brucella* antibody prevalence in a declining Alaskan harbor seal (*Phoca vitulina*) population. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **55**:2.
- Ilhan, Z.; Aksakal, A.; Ekin, I.H.; Gülhan, T.; Solmaz, H. & Erdenlig, S. (2008). Comparison of culture and PCR for the detection of *Brucella melitensis* in blood and lymphoid tissues of serologically positive and negative slaughtered sheep. *Letters in Applied Microbiology*, **46**:301-306.
- Ilhan, Z.; Solmaz, H.; Aksakal, A.; Gülhan, T.; Ekin, I.H. & Boynukara, B. (2007). Comparison of PCR assay and bacteriological culture method for the detection of

- Brucella melitensis* in stomach content samples of aborted sheep fetuses. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, **114**:460-464.
- Irwin, M.J.; Massey, P.D.; Walker, B. & Durrheim, D.N.** (2009). Feral pig hunting: a risk factor for human brucellosis in north-west NSW? *New South Wales Public Health Bulletin*, **20**:192-194.
- Jellison, W.L.; Fishel, C.W. & Cheatum, E.L.** (1953). Brucellosis in a moose, *Alces americanus*. *Journal of Wildlife Management*, **17**:217-218.
- Johnson, J.L.; Barber, T.L.; Frey, M.L. & Nason, G.** (1986a). Serologic survey of selected pathogens in white-tailed and mule deer in western Nebraska. *Journal of Wildlife Diseases*, **22**:515-519.
- Johnson, J.L.; Barber, T.L.; Frey, M.L. & Nason, G.** (1986b). Serosurvey for selected pathogens in hunter-killed pronghorns in western Nebraska. *Journal of Wildlife Diseases*, **22**:87-90.
- Jones, R.L.; Tamayo, R.I.; Porath, W.; Giessman, N.; Selby, L.S. & Buening, G.M.** (1983). A serologic survey of brucellosis in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in Missouri. *Journal of Wildlife Diseases*, **19**:321-323.
- Jungersen, G.; Sorensen, V.; Giese, S.B.; Stack, J.A. & Riber, U.** (2006). Differentiation between serological responses to *Brucella suis* and *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 after natural or experimental infection in pigs. *Epidemiology and Infection*, **134**:347-357.
- Kamel, H.** (1949). Brucellosis in the gazelle (*Gazella dorcas*). *Egyptian Ministry of Agriculture Technical and Scientific Service, Veterinary Department Bulletin*, **10**:265-275. Citado por Rementsova, 1987.
- Karesh, W.B.; Rothstein, A.; Green, W.; Reuter, H.O.; Braselton, W.E.; Torres, A. & Cook, R.A.** (1997). Health evaluation of black-faced impala (*Aepyceros melampus petersi*) using blood chemistry and serology. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, **28**:361-367.
- Kautzsch, S.; Seyfarth, D.; Schöne, R. & Stehmann, R.** (1995). An outbreak of brucellosis in pigs and conclusions derived on the epidemiology of this animal disease. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, **108**:201-205.
- Kim, J.Y.; Her, M.; Kang, S.I.; Lee, K.; Lee, H.K. & Jung, S.C.** (2013). Epidemiologic relatedness between *Brucella abortus* isolates from livestock and wildlife in South Korea. *Journal of Wildlife Diseases*, **49**:451-454.

- Kingscote, B.F. & Bohac, J.G.** (1986). Antibodies to bovine bacterial and viral pathogens in pronghorns in Alberta, 1983. *Journal of Wildlife Diseases*, **22**:511-514.
- Kittelberger, R.; Hilbink, F.; Hansen, M.F.; Penrose, M.; De Lisle, G.W.; Letesson, J.J.; Garin-Bastuji, B.; Searson, J.; Fossati, C.A.; Cloeckaert, A. & Schurig, G.** (1995). Serological crossreactivity between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* O:9. I. Immunoblot analysis of the antibody response to *Brucella* protein antigens in bovine brucellosis. *Veterinary Microbiology*, **47**:257-270.
- Kocan, A.A.; Franzmann, A.W.; Waldrup, K.A. & Kubat, C.J.** (1986). Serological studies of selected infectious diseases of moose (*Alces alces*) from Alaska. *Journal of Wildlife Diseases*, **22**:418-420.
- Köppel, C.; Knopf, L.; Ryser, M.P.; Miserez, R.; Thür, B. & Stärk, K.D.C.** (2007). Serosurveillance for selected infectious disease agents in wild boars (*Sus scrofa*) and outdoor pigs in Switzerland. *European Journal of Wildlife Research*, **53**:212-220.
- Körmendy, B. & Nagy, G.** (1982). The supposed involvement of dogs carrying *Brucella suis* in the spread of swine brucellosis. *Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae*, **30**:3-7.
- Kötsche, W. & Gottschalk, C.** (1974). Enfermedades del conejo y de la liebre. Editorial Acriba, Pp:299.
- Kreeger, T.J.; Cook, W.E.; Edwards, W.H. & Cornish, T.** (2004). Brucellosis in captive Rocky Mountain bighorn sheep (*Ovis canadensis*) caused by *Brucella abortus* biovar 4. *Journal of Wildlife Diseases*, **40**:311-315.
- Kreeger, T.J. & Olsen, S.C** (2002). Brucellosis vaccination in elk. En: Proceedings of Brucellosis in Elk and Bison in the Greater Yellowstone Area. Ed.: Kreeger, T.J. Wyoming Game and Fish Department. Wyoming. Pp:43-50.
- Kudi, A.C.; Kalla, D.J.U.; Kudi, M.C. & Kapio, G.I.** (1997). Brucellosis in camels. *Journal of Arid Environments*, **37**:413-417.
- Kuiken, T.; Leighton, F.A.; Fouchier, R.A.M.; LeDuc, J.W.; Peiris, J.S.M.; Schudel, A.; Stohr, K. & Osterhaus, A.D.M.E.** (2005). Pathogen surveillance in animals. *Science*, **309**:1680-1681.
- Lagier, A.; Brown, S.; Soualah A.; Julier, I.; Tourrand, B.; Albert, D.; Reynes, J. & Garin-Bastuji, B.** (2005). Brucellose aiguë à *Brucella suis* biovar 2 chez un chasseur de sanglier. *Médecine et Maladies Infectieuses*, **35**:S185.
- Lapaque, N.; Moriyón, I.; Moreno, E. & Gorvel, J.P.** (2005). *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Current Opinion in Microbiology*, **8**:60-66.

- Lara-Lara, J.; Argáez-Rodríguez, F.; Rodríguez-Buenfil, J. & Alzina-López, A.** (1993). Brucelosis canina. Estudio serológico en perros de la ciudad de Mérida, Yucatán. *Revista Biomédica*, **4**:15-18.
- Lavín, S.; Blasco, J.M.; Valverde, R.; Mentaberre, G.; Casas, E.; Marín, C.M. & Marco, I.** (2006). Descripción del primer caso de Brucelosis en la Liebre Europea (*Lepus europaeus*) en la península Ibérica. *Información Veterinaria: Revista de la organización Colegial Veterinaria Española*, **10**:18-21.
- Leal-Klevezas, D.S.; Martínez-Vázquez, I.O.; López-Merino, A. & Martínez-Soriano, J.P.** (1995). Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. *Journal of Clinical Microbiology*, **33**:3087-3090.
- León-Vizcaíno, L.** (1991). Ecopatología de la cabra montés en Cazorla. *I Simposium sobre gestión de poblaciones de cabra montés (Capra pyrenaica, Schinz)*. Tortosa, febrero de 1991. Resúmenes, Pp:42-49.
- León-Vizcaíno, L.; De Meneghi, D.; Meneguz, P.G.; Rosati, S. & Rossi, L.** (1992). Investigaciones serológicas sobre enfermedades infecciosas de la cabra montesa (*Capra pyrenaica*) en el Parque Natural Sierra de las Nieves, Ronda-Málaga (E): Resultados y consideraciones preliminares. *Actas del I Congreso Internacional del Género Capra en Europa*, Ronda, 20-22 de octubre de 1992, Pp:219-222.
- León-Vizcaíno, L.; Garrido-Abellán, F.; González-Candela, M.; Pérez-Béjar, L.; Cubero-Pablo, M.J.; Perales-Flores, A.; Pacheco, I. & Martín-Atance, P.** (2009). Ineficacia de los rumiantes silvestres como reservorio de *Brucella* en el medio natural andaluz (Sierras Béticas). *V World Conference on Mountain Ungulates*. Granada, 10-14 de noviembre de 2009. Book of abstracts, p:303.
- León-Vizcaíno, L.; Molera, M.; Gasca, A.; Garrido, F.; Rodríguez, D. & Hierro, L.** (1985). Serological survey of prevalence of antibodies to brucellosis in wild ruminants in Jaén (Spain). *Verhandlungsbericht des 27 Internationalen Symposiums über die Erkrankungen Zootiere*, **27**:455-461.
- Leong, D.; Diaz, R.; Milner, K.; Rudbach, J. & Wilson, J.B.** (1970). Some structural and biological properties of *brucella* endotoxin. *Infection and Immunity*, **1**:174-182.
- Leuenberger, R.; Boujon, P.; Thür, B.; Miserez, R.; Garin-Bastuji, B.; Rüfenacht, J. & Stärk, K.D.C.** (2007). Prevalence of classical swine fever, Aujeszky's disease and brucellosis in a population of wild boar in Switzerland. *Veterinary Record*, **160**:362-368.

- Leyla, G.; Kadri, G. & Umran, O. (2003). Comparison of polymerase chain reaction and bacteriological culture for the diagnosis of sheep brucellosis using aborted fetus samples. *Veterinary Microbiology*, **93**:53-61.
- López-Goñi, I.; García-Yoldi, D.; Marín, C.M.; de Miguel, M.J.; Barquero-Calvo, E.; Guzmán-Verri, C.; Albert, D. & Garin-Bastuji, B. (2011). New Bruce-ladder multiplex PCR assay for the biovar typing of *Brucella suis* and the discrimination of *Brucella suis* and *Brucella canis*. *Veterinary Microbiology*, **154**:152-155.
- López-Goñi, I.; García-Yoldi, D.; Marín, C.M.; de Miguel, M.J.; Muñoz, P.M.; Blasco, J.M.; Jacques, I.; Grayon, M.; Cloeckert, A.; Ferreira, A.C.; Cardoso, R.; Corrêa de Sá, M.I.; Walravens, K.; Albert, D. & Garin-Bastuji, B. (2008). Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. *Journal of Clinical Microbiology*, **46**:3484-3487.
- López-Olvera, J.R.; Vidal, D.; Vicente, J.; Pérez, M.; Luján, L. & Gortázar, C. (2009). Serological survey of selected infectious diseases in mouflon (*Ovis aries musimon*) from south-central Spain. *European Journal of Wildlife Research*, **55**:75-79.
- Lord, V.R. & Flores, R. (1983). *Brucella* spp. from the capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) in Venezuela: serologic studies and metabolic characterization of isolates. *Journal of Wildlife Diseases*, **19**:308-314.
- Lord, V.R. & Lord, R.D. (1991). *Brucella suis* infection in Collared pecaries in Venezuela. *Journal of Wildlife Diseases*, **27**:477-481.
- Loulergue, J.; Verger, J.M.; Chavanne, D.; Grayon, M.; Prieur, D. & Groussin, P. (1979). A propos d'un cas de brucellose humaine à *Brucella suis* biotype 1. *Médecine et Maladies Infectieuses*, **9**:67-71.
- Lucero, N.E.; Corazza, R.; Almuzara, M.N.; Reynes, E.; Escobar, G.I.; Boeri, E. & Ayala, S.M. (2010). Human *Brucella canis* outbreak linked to infection in dogs. *Epidemiology and Infection*, **138**:280-285.
- Lucero, N.E.; Escobar, G.I.; Ayala, S.M. & Jacob, N. (2005). Diagnosis of human brucellosis caused by *Brucella canis*. *Journal of Medical Microbiology*, **54**:457-461.
- Ludt, C.J.; Schroeder, W.; Rottmann, O. & Kuehn, R. (2004). Mitochondrial DNA phylogeography of red deer (*Cervus elaphus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **31**:1064-1083.
- Luna-Martínez, J.E. & Mejía-Terán, C. (2002). Brucellosis in Mexico: current status and trends. *Veterinary Microbiology*, **90**:19-30.

- Lundervold, M.** (2001). Infectious diseases of saiga antelopes and domestic livestock in Kazakhstan. Tesis Doctoral. University of Warwick, UK. Pp:254.
- Lynch, M.; Duignan, P.J.; Taylor, T.; Nielsen, O.; Kirkwood, R.; Gibbens, J. & Arnould, J.P.** (2011). Epizootiology of *Brucella* infection in Australian fur seals. *Journal of Wildlife Diseases*, **47**:352-363.
- MacMillan, A.** (1990). Conventional serological tests. En: Animal Brucellosis. Eds.: Nielsen, K. & Duncan, J.R. CRC Press. Boston Pp:153-197.
- Madsen, M. & Anderson, E.C.** (1995). Serologic survey of Zimbabwean wildlife for brucellosis. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, **26**:240-245.
- Maichak, E.J.; Scurlock, B.M.; Rogerson, J.D.; Meadows, L.L.; Barbknecht, A.E.; Edwards, W.H. & Cross, P.C.** (2009). Effects of management, behavior and scavenging on risk of brucellosis transmission in elk of Western Wyoming. *Journal of Wildlife Diseases*, **45**:398-410.
- Manterola, L.; Tejero-Garcés, A.; Ficapal, A.; Shopayeva, G.; Blasco, J.M.; Marín, C.M.; & López-Goñi, I.** (2003). Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in semen samples from rams. *Veterinary Microbiology*, **92**:65-72.
- Marianelli, C.; Martucciello, A.; Tarantino, M.; Vecchio, R.; Iovane, G. & Galiero, G.** (2008). Evaluation of molecular methods for the detection of *Brucella* species in water buffalo milk. *Journal of Dairy Science*, **91**:3779-3786.
- Marín, C.M.; Alabart, J.L. & Blasco, J.M.** (1996b). Effect of antibiotics contained in two *Brucella* selective media on growth of *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. ovis*. *Journal of Clinical Microbiology*, **34**:426-428.
- Marín, C.M.; Jiménez de Bagüés, M.P.; Barberán, M. & Blasco, J.M.** (1996a). Comparison of two selective media for the isolation of *Brucella melitensis* from naturally infected sheep and goats. *Veterinary Record*, **138**:409-411.
- Marques de Freitas, H.** (2006). Natural hybridization between the Iberian hare (*Lepus granatensis*) and the brown hare (*L. europaeus*) in northern Iberian Peninsula. Tesis Doctoral. Universidade do Oporto. Pp:74.
- Marreros, N.; Hüseyin, D.; Albin, S.; Frey, C.F.; Abril, C.; Vogt, H.R.; Holzwarth, N.; Wirz-Dittus, S.; Friess, M.; Engels, M.; Borel, N.; Willis, C.S.; Signer, C.; Hoelzle, L.E. & Ryser-Degiorgis, M.P.** (2011). Epizootologic investigations of selected abortive agents in free-ranging Alpine ibex (*Capra ibex ibex*) in Switzerland. *Journal of Wildlife Diseases*, **47**:530-543.

- Martín-Atance, P. & León-Vizcaíno, L.** (2009). Evaluación serológica de agentes contagiosos asociados al síndrome de mortalidad perinatal congénita en los rumiantes de la Serranía de Cuenca. *V World Conference on Mountain Ungulates*. Granada, 10-14 de noviembre de 2009. Libro de ponencias, p:315.
- Martínez, D.; Dieste, L.; Revilla, M.; Muñoz, M.P.; Arnal, M.C.; de Miguel, M.J.; Barberán, M.; Marín, C.; Fernández de Luco, D. & Blasco, J.M.** (2010). Preliminary studies on *Brucella suis* infection in wild boars *Sus scrofa*, hares (*Lepus granatensis* and *L. europaeus*) and hunting dogs in Aragon, Spain. Póster. European Wildlife Diseases Association Conference, Vlieland (The Netherlands). Del 13 al 16 de septiembre 2010.
- Martínez, D.; Revilla, M.; Muñoz, M.P.; Arnal, M.C.; de Miguel, M.J.; Marín, C.; Fernández de Luco, D.; Blasco, J.M. & Barberán, M.** (2008). Brucelosis por *Brucella suis* biovar. 2 en jabalíes de Aragón. *26^{èmes} Rencontres du G.E.E.F.S.M.* Faucon de Barcelonnette (France). Del 15 al 18 de mayo 2008.
- Martínez, A.; Salinas, A.; Martínez, F.; Cantu, A. & Miller, D.K.** (1999). Serosurvey for selected disease agents in white-tailed deer from Mexico. *Journal of Wildlife Diseases*, **35**:799-803.
- Martínez de Tejada, G. & Moriyón, I.** (1993). The outer membranes of *Brucella* spp. are not barriers to hydrophobic permeants. *Journal of Bacteriology*, **175**:5273-5275.
- Martínez de Tejada, G.; Pizarro-Cerdá, J.; Moreno, E. & Moriyón, I.** (1995). The outer membranes of *Brucella* spp. are resistant to bactericidal cationic peptides. *Infection and Immunity*, **63**:3054-3061.
- Mason, R.J. & Fleming, P.J.S.** (1999). Serological survey for *Brucella* antibodies in feral pigs from eastern Australia. *Australian Veterinary Journal*, **77**:331-332.
- Mateu de Antonio, E.M. & Martín Castillo, M.** (1993). Encuesta seroepidemiológica frente a *Brucella canis* y brucelas de tipo liso en perros. *Medicina Veterinaria*, **10**:241-243.
- Mauget, R. & Boissin, J.** (1987). Seasonal changes in testis weight and testosterone concentration in the European Wild Boar (*Sus scrofa* L.). *Animal Reproduction Science*, **13**:67-74.
- Mayor, P.; Le Pendu, Y.; Guimarães, D.A.; da Silva, J.V.; Tavares, H.L.; Tello, M.; Pereira, W.; López-Béjar, M. & Jori, F.** (2006). A health evaluation in a colony of captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*) in the Eastern Amazon. *Research in Veterinary Science*, **81**:246-253.

- McAloose, D. & Mewton, A.L.** (2009). Wildlife cancer: a conservation perspective. *Nature Reviews. Cancer*, **9**:517-526.
- McCaughey, W.J.** (1968). Brucellosis in wildlife. *Symposia of the Zoological Society of London*, **24**:99.
- McCorquodale, S.M. & DiGiacomo, R.F.** (1985). The role of wild North American ungulates in the epidemiology of bovine brucellosis: a review. *Journal of Wildlife Diseases*, **21**:351-357.
- McCue, P.M. & O'Farrell, T.P.** (1988). Serological survey for selected diseases in the endangered San Joaquin kit fox (*Vulpes macrotis mutica*). *Journal of Wildlife Diseases*, **24**:274-281.
- McDermott, J.J. & Arimi, S.M.** (2002). Brucellosis in sub-Saharan Africa: epidemiology, control and impact. *Veterinary Microbiology*, **90**:111-134.
- McDiarmid, A. & Matthews, P.R.** (1974). Brucellosis in wildlife. *Veterinary Record*, **94**:559.
- McGiven, J.A.** (2013). New developments in the immunodiagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. *Revue Scientifique et Technique de L'Office International des Epizooties*, **32**:163-176.
- McNally, A.; Cheasty, T.; Fearnley, C.; Dalziel, R.W.; Paiba, G.A.; Manning, G. & Newell, D.G.** (2004). Comparison of the biotypes of *Yersinia enterocolitica* isolated from pigs, cattle and sheep at slaughter and from humans with yersiniosis in Great Britain during 1999-2000. *Letters in Applied Microbiology*, **39**:103-108.
- Meirelles-Bartoli, R.B.; Mathias, L.A. & Samartino, L.E.** (2012). Brucellosis due to *Brucella suis* in a swine herd associated with a human clinical case in the State of São Paulo, Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, **44**:1575-1579.
- Melzer, F.; Lohse, R.; Mieper, H.; Liebert, M. & Sachse, K.** (2007). A serological study on brucellosis in wild boars in Germany. *European Journal of Wildlife Research*, **53**:153-157.
- Merrell, C.L. & Wright, D.N.** (1978). A serologic survey of mule deer and elk in Utah. *Journal of Wildlife Diseases*, **14**:471-478.
- Metcalf, H.E.; Luchsinger, D.W. & Ray, W.C.** (1994). Brucellosis. En: Handbook of Zoonoses: section A. Bacterial, Rickettsial, Chlamydial, and Mycotic, 2th Edition. Eds.: Beran, G.W. & Steele, J.H. CRC Press. Pp:9-38.

- Meyer, M.E.** (1966). Identification and virulence studies of *Brucella* strains isolated from Eskimos and reindeer in Alaska, Canada and Russia. *American Journal of Veterinary Research*, **27**:355-358.
- Meyer, M.E.** (1974). Advances in research on brucellosis, 1957-1972. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*, **18**:231-250.
- Michaux-Charachon, S.; Bourg, G.; Jumas-Bilak, E.; Guigue-Talet, P.; Allardet-Servent, A.; O'Callaghan, D. & Ramuz, M.** (1997). Genome structure and phylogeny in the genus *Brucella*. *Journal of Bacteriology*, **179**:3244-3249.
- Mikolon, A.B.; Gardner, I.A.; Hernandez de Anda, J. & Hietala, S.K.** (1998). Risk factors for brucellosis seropositivity of goat herds in the Mexicali Valley of Baja California, Mexico. *Preventive Veterinary Medicine*, **37**:185-195.
- Misiorowska, M. & Wasilewski, M.** (2012). Survival and causes of death among released brown hares (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) in Central Poland. *Acta Theriologica*, **57**:305-312.
- Mittal, K.R.; Tizard, I.R. & Barnum, D.A.** (1985). Serological cross-reactions between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* 0:9. *International Journal of Zoonoses*, **12**:219-227.
- Mohler, J.R.** (1917). Annual Report of the United States Bureau of Animal Industry, 105-106. Department of Agriculture, Government Printing Office, Washington, D.C. Citado por Rhyan, 2000.
- Moloney, B.** (2012). Preliminary results from porcine brucellosis surveillance in feral pigs in northern New South Wales. *Animal Health Surveillance Quarterly Report*, **17**:2-3.
- Montagnaro, S.; Sasso, S.; De Martino, L.; Longo, M.; Iovane, V.; Ghiurmino, G.; Pisanelli, G.; Nava, D.; Baldi, L. & Pagnini, U.** (2010). Prevalence of antibodies to selected viral and bacterial pathogens in wild boar (*Sus scrofa*) in Campania Region, Italy. *Journal of Wildlife Diseases*, **46**:316-319.
- Moreno, E.** (1992). Evolution of *Brucella*. En: Plommet M, ed. Prevention of brucellosis in the Mediterranean countries. Wageningen: Pudoc Scientific Publishers. Pp:198-218.
- Moreno, E.** (2002). Brucellosis in Central America. *Veterinary Microbiology*, **90**:31-38.
- Moreno, E.; Mayer, H. & Moriyón, I.** (1987). Characterization of a native polysaccharide hapten from *Brucella melitensis*. *Infection and Immunity*, **55**:2850-2853.

- Moreno, E. & Moriyón, I.** (2001). Genus *Brucella*. In: M.Dworkin, ed. The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community. Springer-Verlag, Nueva York.
- Moreno, E.; Speth, S.L.; Jones, L.M. & Berman, D.T.** (1981). Immunochemical characterization of *Brucella* lipopolysaccharides and polysaccharides. *Infection and Immunity*, **31**:214-222.
- Morgan, W.J.; MacKinnon, D.J.; Lawson, J.R. & Cullen, G.A.** (1969). The rose bengal plate agglutination test in the diagnosis of brucellosis. *Veterinary Record*, **85**:636-641.
- Moriyón, I. & López-Goñi, I.** (2002). Taxonomía, estructura antigénica y características genéticas de *Brucella mellitensis* y *Brucella ovis*. En: Brucelosis Ovina y Caprina, Ovis, 82. Pp:55-71.
- Mörner, T.; Obendorf, D.L.; Artois, M. & Woodford, M.H.** (2002). Surveillance and monitoring of wildlife diseases. *Revue Scientifique et Technique de L'Office International des Epizooties*, **21**:67-76.
- Mukherjee, F.; Jain, J.; Patel, V. & Nair, M.** (2007). Multiple genus-specific markers in PCR assays improve the specificity and sensitivity of diagnosis of brucellosis in field animals. *Journal of Medical Microbiology*, **56**:1309-1316.
- Muma, J.B.; Lund, A.; Siamudaala, V.M.; Munang'andu, H.M.; Munyeme, M.; Matope, G.; Nielsen, K.; Djønne, B.; Godfroid, J.; Tryland, M. & Skjerve, E.** (2010). Serosurvey of *Brucella* spp. infection in the Kafue lechwe (*Kobus leche kafuensis*) of the Kafue flats in Zambia. *Journal of Wildlife Diseases*, **46**:1063-1069.
- Muma, J.B.; Munyeme, M.; Matope, G.; Siamudaala, V.M.; Munang'andu, H.M.; Matandiko, W.; Godfroid, J.; Skjerve, E. & Tryland, M.** (2011). *Brucella* seroprevalence of the Kafue lechwe (*Kobus leche kafuensis*) and Black lechwe (*Kobus leche smithemani*): exposure associated to contact with cattle. *Preventive Veterinary Medicine*, **100**:256-260.
- Muñoz, P.M.; Blasco, J.M.; Engel, B.; de Miguel, M.J.; Marín, C.M.; Dieste, L. & Mainar-Jaime, R.C.** (2012). Assessment of performance of selected serological tests for diagnosing brucellosis in pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **146**:150-158.
- Muñoz, P.M.; Boadella, M.; Arnal, M.C.; de Miguel, M.J.; Revilla, M.; Martínez, D.; Vicente, J.; Acevedo, P.; Oleaga, A.; Ruiz-Fons, F.; Marín, C.M., Prieto, J.M.; de la Fuente, J.; Barral, M.; Barberán, M.; Fernández de Luco, D.; Blasco, J.M. &**

- Gortázar, C.** (2010). Spatial distribution and risk factors of Brucellosis in Iberian wild ungulates. *BMC Infectious Diseases*, **10**:46.
- Muñoz, P.M.; de Miguel, M.J.; Blasco, J.M. & Marín, C.M.** (2003). Porcine brucellosis in Spain: serological and bacteriological study of 11 outbreaks. X Jornadas sobre Producción Animal. Zaragoza. Pp:417-419.
- Muñoz, P.M.; García-Castrillo, G.; López-García, P.; González-Cueli, J.C.; de Miguel, M.J.; Marín, C.M.; Barberán, M. & Blasco, J.M.** (2006). Isolation of *Brucella* species from a live-stranded striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) in Spain. *Veterinary Record*, **158**:450-451.
- Muñoz, P.M.; Marín, C.M.; Monreal, D.; González, D.; Garin-Bastuji, B.; Díaz, R.; Mainar-Jaime, R.C.; Moriyón, I. & Blasco, JM.** (2005). Efficacy of several serological tests and antigens for diagnosis of bovine brucellosis in the presence of false-positive serological results due to *Yersinia enterocolitica* O:9. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **12**:141-151.
- Murie, O.** (1951). The elk of North America. Stackpole Co., Harrisburg, Pennsylvania and The Wildlife Management Institute. Washington, D.C. Pp:376. Citado por Rhyan, 2000.
- Neiland, K.A.** (1970). Rangiferine brucellosis in Alaskan canids. *Journal of Wildlife Diseases*, **6**:136-139.
- Neiland, K.A.** (1975). Further observations on rangiferine brucellosis in Alaskan carnivores. *Journal of Wildlife Diseases*, **11**:45-53.
- Neiland, K.A.; King, J.A.; Huntley, B.E. & Skoog, R.O.** (1968). The diseases and parasites of Alaskan wildlife populations. I. Some observations on brucellosis in caribou. *Wildlife Disease*, **4**:27-36.
- Neiland, K.A. & Miller, L.G.** (1981). Experimental *Brucella suis* type 4 infections in domestic and wild Alaskan carnivores. *Journal of Wildlife Diseases*, **17**:183-189.
- Neumann, E.J. & Bonistalli, K.N.** (2009). Effect of blood sample handling postcollection on *Erysipelothrix rhusiopathiae* antibody titres. *Veterinary Journal*, **180**:325-329.
- Nielsen, K.** (2002). Diagnosis of brucellosis by serology. *Veterinary Microbiology*, **90**:447-459.
- Nielsen, K.** (2012). Bovine brucellosis. En: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2012. Capítulo 2.4.3. Ed: Office International des Epizooties. Paris. France.

- Nielsen, K. & Gall, D. (2001). Fluorescence polarization assay for the diagnosis of brucellosis: a review. *Journal of Immunoassay & Immunochemistry*, **22**:183-201.
- Nielsen, K.; Gall, D.; Smith, P.; Vigliocco, A.; Perez, B.; Samartino, L.; Nicoletti, P.; Dajer, A.; Elzer, P. & Enright, F. (1999). Validation of the fluorescence polarization assay as a serological test for the presumptive diagnosis of porcine brucellosis. *Veterinary Microbiology*, **68**:245-253.
- Nielsen, O.; Nielsen, K.; Braun, R. & Kelly, L. (2005). A comparison of four serologic assays in screening for *Brucella* exposure in Hawaiian monk seals. *Journal of Wildlife Diseases*, **41**:126-133.
- Nielsen, K.; Smith, P.; Widdison, J.; Gall, D.; Kelly, L.; Kelly, W. & Nicoletti, P. (2004). Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Escherichia coli* O157:H7. *Veterinary Microbiology*, **100**:25-30.
- Nol, P.; Olsen, S.C. & Rhyan, J.C. (2009). Experimental infection of Richardson's ground squirrels (*Spermophilus richardsonii*) with attenuated and virulent strains of *Brucella abortus*. *Journal of Wildlife Diseases*, **45**:189-195.
- Norton, A.J.; Jordan, S. & Yeomans, P. (1994). Brief, high-temperature heat denaturation (pressure cooking): a simple and effective method of antigen retrieval for routinely processed tissues. *Journal of Pathology*, **173**:371-379.
- Noviello, S.; Gallo, R.; Kelly, M.; Limberger, R.J.; DeAngelis, K.; Cain, L.; Wallace, B. & Dumas, N. (2004). Laboratory-acquired brucellosis. *Emerging Infectious Diseases*, **10**:1848-1850.
- Nymo, I.H.; Godfroid, J.; Åsbakk, K.; Larsen, A.K.; das Neves, C.G.; Rødven, R. & Tryland, M. (2013). A protein A/G indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of anti-*Brucella* antibodies in Arctic wildlife. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **25**:369-375.
- Ocampo-Sosa, A.A.; Agüero-Balbín, J. & García-Lobo, J.M. (2005). Development of a new PCR assay to identify *Brucella abortus* biovars 5, 6 and 9 and the new subgroup 3b of biovar 3. *Veterinary Microbiology*, **110**:41-51.
- Ocholi, R.A.; Bertu, W.J.; Kwaga, J.K.; Ajogi, I.; Bale, J.O. & Okpara, J. (2004). Carpal bursitis associated with *Brucella abortus* in a horse in Nigeria. *Veterinary Record*, **155**:566-567.
- Oliver, W.L.R. (1993). Pigs, Peccaries and Hippos: Status Survey and Conservation Action Plan. IUCN. Gland, Switzerland.

- Olsen, S.C. (2010). Brucellosis in the United States: role and significance of wildlife reservoirs. *Vaccine*, **28**:73-76.
- Olsen, S.C. (2013). Recent developments in livestock and wildlife brucellosis vaccination. *Revue Scientifique et Technique de L'Office International des Epizooties*, **32**:207-217.
- Olsen, S.C.; Garin-Bastuji, B.; Blasco, J.M.; Nicola, A.M. & Samartino, L. (2012). Brucellosis. En: Diseases of Swine, 10th Edition. Eds.: Zimmerman, J.J.; Kariiker, L.A.; Ramirez, A.; Schwartz, K.J. & Stevenson, G.W. Wiley-Blackwell. Pp:697-708.
- Omer, S.A.; Al-Megrin, W.I.; Alagaili, A.N.; Elobeid, M.A. & Mohammed, O.B. (2011). A new protocol for the treatment of *Brucella melitensis* in Neumann's gazelle (*Gazella erlangeri*) from Saudi Arabia using oxytetracycline and streptomycin. *African Journal of Biotechnology*, **53**:11075-11080.
- Ostrowski, S.; Anajariyya, S.; Kamp, E.M. & Bedin, E. (2002). Isolation of *Brucella melitensis* from an Arabian oryx (*Oryx leucoryx*). *Veterinary Record*, **150**:186-188.
- Osuna, D.; Prada, C.; Herrero, J. & Marco, J. (2006). Distribución de los ungulados silvestres en Aragón (2001-2005) determinada a partir de encuestas. *Lucas Mallada*, **13**:193-214.
- Palacios, F. & Meijide, M. (1979). Distribución geográfica y hábitat de las liebres en la península Ibérica. *Naturalia Hispanica*, **19**:1-40.
- Paling, R.W.; Waghela, S.; Macowan, K.J. & Heath, B.R. (1988). The occurrence of infectious diseases in mixed farming of domesticated wild herbivores and livestock in Kenya. II. Bacterial diseases. *Journal of Wildlife Diseases*, **24**:308-316.
- Pandey, G.S.; Kobayashi, K.; Nomura, Y.; Nambota, A.; Mwima, H.K. & Suzuki, A.K. (1999). Studies on sero-prevalence of Brucellosis in Kafue lechwe (*Kobus leche kafuensis*) in Zambia. *Indian Veterinary Journal*, **76**:275-278.
- Paolicchi, F.A.; Terzolo, H.R. & Campero, C.M. (1993). Isolation of *Brucella suis* from the semen of a ram. *Veterinary Record*, **132**:67.
- Pappas, G. (2010). The changing *Brucella* ecology: novel reservoirs, new threats. *International journal of Antimicrobial Agents*, **36**:8-11.
- Pappas, G.; Papadimitriou, P.; Akritidis, N.; Christou, L. & Tsianos, E.V. (2006). The new global map of human brucellosis. *Lancet Infectious Diseases*, **6**:91-99.
- Paton, N.I.; Tee, N.W.S.; Vu, C.K.F. & Teo, T.P. (2001). Visceral abscesses due to *Brucella suis* infection in a retired pig farmer. *Clinical Infectious Diseases*, **32**:129-130.

- Paulsen, I.T.; Seshadri, R.; Nelson, K.E.; Eisen, J.A.; Heidelberg, J.F.; Read, T.D.; Dodson, R.J.; Umayam, L.; Brinkac, L.M.; Beanan, M.J.; Daugherty, S.C.; Deboy, R.T.; Durkin, A.S.; Kolonay, J.F.; Madupu, R.; Nelson, W.C.; Ayodeji, B.; Kraul, M.; Shetty, J.; Malek, J.; Van Aken, S.E.; Riedmuller, S.; Tettelin, H.; Gill, S.R.; White, O.; Salzberg, S.L.; Hoover, D.L.; Lindler, L.E.; Halling, S.M.; Boyle, S.M. & Fraser, C.M. (2002). The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **99**:13148-13153.
- Perrett, L.L.; Dawson, C.E.; Davison, N. & Quinney, S. (2004). *Brucella* infection of lungworms from a harbour porpoise. *Veterinary Record*, **154**:800.
- Pidgeon, G.L.; Scanlan, C.M.; Miller, W.R. & Mayer, T.W. (1987). Experimental infection of dogs with *Brucella abortus*. *Cornell Veterinarian*, **77**:339-347.
- Pikula, J.; Beklova, M.; Holesovska, Z.; Skocovska, B. & Treml, F. (2005). Ecology of brucellosis of the european hare in the Czech Republic. *Veterinární Medicína*, **50**:105-109.
- Poester, F.P.; Gonçalves, V.S. & Lage, A.P. (2002). Brucellosis in Brazil. *Veterinary Microbiology*, **90**:55-62.
- Poli, A.; Mancianti, F.; Marconcini, A.; Cerri, D. & Agrimi, P. (1987). Diseases of wild-living hares (*Lepus europaeus*, Pallas) in Tuscany. *Proceedings of the 29th International Symposium of Diseases of Zoo Animals*. Akademie-Verlag, Berlin, Germany. Pp:341-346.
- Pouillot, R.; Garin-Bastuji, B.; Gerbier, G.; Coche, Y.; Cau, C.; Dufour, B. & Moutou, F. (1997). The brucellin skin test as a tool to differentiate false positive serological reactions in bovine brucellosis. *Veterinary Research*, **28**:365-374.
- Prichard, W.D.; Hagen, K.W.; Gorham, J.R. & Stiles, F.C. Jr. (1971). An epizootic of brucellosis in mink. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **159**:635-637.
- Prior, M.G. (1976). Isolation of *Brucella abortus* from two dogs in contact with bovine brucellosis. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, **40**:117-118.
- Purroy, F.J. (2011). Liebre ibérica - *Lepus granatensis*. En: Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Eds.: Salvador, A. & Cassinello, J. Museo Nacional de Ciencias Naturales. Madrid.
- Quaranta, V.; Farina, R.; Poli, A.; Cerri, D. & Palazzo, L. (1995). Sulla presenza di *Brucella suis* biovar 2 nella lepre in Italia. *Selezione Veterinaria*, **36**:953-958.

- Qureshi, T.; Stittmatter, J.; Turner, K. & Davis, D.S.** (1999). Experimental infection of white-tailed deer with rangiferine brucellosis. *Journal of Wildlife Diseases*, **35**:388-391.
- Ragan, V.E.** (2002). The animal and plant health inspection service (APHIS) brucellosis eradication program in the United States. *Veterinary Microbiology*, **90**:11-18.
- Ragan, V.; Vroegindewey, G. & Babcock, S.** (2013). International standards for brucellosis prevention and management. *Revue Scientifique et Technique de L'Office International des Epizooties*, **32**:189-198.
- Rah, H.; Chomel, B.B.; Follmann, E.H.; Kasten, R.W.; Hew, C.H.; Farver, T.B.; Garner, G.W. & Amstrup, S.C.** (2005). Serosurvey of selected zoonotic agents in polar bears (*Ursus maritimus*). *Veterinary Record*, **156**:7-13.
- Ramamoorthy, S.; Woldemeskel, M.; Ligett, A.; Snider, R.; Cobb, R. & Rajeev, S.** (2011). *Brucella suis* infection in dogs, Georgia, USA. *Emerging Infectious Diseases*, **17**:2386-2387.
- Randhawa, A.S.; Kelly, V.P. & Baker, E.F. Jr.** (1977). Agglutinins to *Coxiella burnetii* and *Brucella* spp, with particular reference to *Brucella canis*, in wild animals of southern Texas. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **171**:939-942.
- Refai, M.** (2002). Incidence and control of brucellosis in the Near East region. *Veterinary Microbiology*, **90**:81-110.
- Rementsova, M.M.** (1987). Brucellosis in wild animals. Amerind Publishing Co, New Delhi. Pp:323.
- Renoux, G.** (1960). Brucellose spontanee du rat, *Rattus norvegicus*. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, **37**:113-115.
- Revilla, M.** (2012). Estudio sanitario de la cabra montés *Capra pirenaica hispánica* en Aragón. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza. Pp:207.
- Revilla, M.; Alzaga, V.; Arnal, M.C.; Gortázar, C. & Fernández de Luco, D.** (2006). Principales patologías en la liebre ibérica (*Lepus granatensis*). 24èmes G.E.E.S.F.M. 9 au 11 juin, Roquetas, España.
- Rhyan, J.C.** (2000). Brucellosis in terrestrial wildlife and marine mammals. En: *Emerging Diseases of Animals*. Eds.: Brown, C. & Bolin, C. ASM Press. Washington, D.C. Pp:161-184.
- Rhyan, J.C.** (2013). Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in wildlife. *Revue Scientifique et Technique de L'Office International des Epizooties*, **32**:127-136.

- Rhyan, J.C.; Aune, K.; Roffe, T.J.; Ewalt, D.R.; Hennager, S.G.; Gidlewski, T.; Olsen, S. & Clarke, R. (2009). Pathogenesis and epidemiology of brucellosis in Yellowstone bison: serologic and culture results from adult females and their progeny. *Journal of Wildlife Diseases*, **45**:729-739.
- Rhyan, J.C.; Gidlewski, T.; Roffe, T.J.; Aune, K.; Philo, L.M. & Ewalt, D. R. (2001). Pathology of brucellosis in bison from Yellowstone National Park. *Journal of Wildlife Diseases*, **37**:101-109.
- Rhyan, J.C.; Quinn, W.J.; Stackhouse, L.S.; Henderson, J.J.; Ewalt, D.R.; Payeur, J.B.; Johnson, M. & Meagher, M. (1994). Abortion caused by *Brucella abortus* biovar 1 in a free-ranging bison (*Bison bison*) from Yellowstone National Park. *Journal of Wildlife Diseases*, **30**:445-446.
- Rhyan, J.C. & Spraker, T.R. (2010). Emergence of diseases from wildlife reservoirs. *Veterinary Pathology*, **47**:34-39.
- Riber, U. & Jungersen, G. (2007). Cell-mediated immune responses differentiate infections with *Brucella suis* from *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 in pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **116**:13-25.
- Ridler, A.L.; West, D.M. & Collett, M.G. (2012). Pathology of *Brucella ovis* infection in red deer stags (*Cervus elaphus*). *New Zealand Veterinary Journal*, **60**:146-149.
- Ridler, A.L.; West, D.M.; Stafford, K.J. & Wilson, P.R. (2006). Persistence, serodiagnosis and effects on semen characteristics of artificial *Brucella ovis* infection in red deer stags. *New Zealand Veterinary Journal*, **54**:85-90.
- Riemann, H.P.; Ruppner, R.; Willeberg, P.; Franti, C.E.; Elliott, W.H.; Fisher, R.A.; Brunetti, O.A.; Aho, J.H. Jr.; Howarth, J.A. & Behymer, D.E. (1979). Serologic profile of exotic deer at Point Reyes National Seashore. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **175**:911-913.
- Riezu-Boj, J.I.; Moriyón, I.; Blasco, J.M.; Gamazo, C. & Díaz, R. (1990). Antibody response to *Brucella ovis* outer membrane proteins in ovine brucellosis. *Infection and Immunity*, **58**:489-494.
- Risco, D.; García, A.; Serrano, E.; Fernández-Llario, P.; Benítez, J.M.; Martínez, R.; García, W.L. & de Mendoza, J.H. (2013). High-density dependence but low impact on selected reproduction parameters of *Brucella suis* biovar 2 in wild boar hunting estates from South-Western Spain. *Transboundary and Emerging Diseases*, **24**.

- Robson, J.M.; Harrison, M.W.; Wood, R.N.; Tilse, M.H.; McKay, A.B. & Brodribb, T.R.** (1993). Brucellosis: re-emergence and changing epidemiology in Queensland. *Medical Journal of Australia*, **159**:153-158.
- Rodríguez Alonso, M.; Palacios Alberti, J.; Martín Fernández, J.A.; Martín García, P.; Sánchez Cabrero, C.; Naveso Yelmo, M.A.; Muñoz Pulido, R. & Yanes García, T.** (1997). La Liebre. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid-Barcelona-México. Pp:161.
- Rodríguez-Luengo, J.L.; Fandós, P. & Soriguer, R.C.** (2002). *Ovis gmelini* Pallas, 1811. En: Atlas de los mamíferos terrestres de España. Eds.: Palomo, L.J. & Gisbert, J. Dirección General de Conservación de la Naturaleza-SECEM-SECEMU. Madrid. Pp:334-337.
- Roffe, T.J.; Rhyan, J.C.; Aune, K.; Ewalt, D.R.; Gidlewski, T. & Hennager, S.G.** (1999). Brucellosis in Yellowstone National Park bison: quantitative serology and infection. *Journal of Wildlife Management*, **63**:1132-1137.
- Rojas, N.; Freer, E.; Weintraub, A.; Ramirez, M.; Lind, S. & Moreno, E.** (1994). Immunochemical identification of *Brucella abortus* lipopolysaccharide epitopes. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **2**:206-213.
- Romero, C.; Pardo, M.; Grilló, M.J.; Díaz, R.; Blasco, J.M. & López-Goñi, I.** (1995). Evaluation of PCR and indirect enzyme-linked immunosorbent assay on milk samples for diagnosis of brucellosis in dairy cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, **33**:3198-3200.
- Rosell, C.; Fernández-Llario, P. & Herrero, J.** (2001). El Jabalí (*Sus scrofa* Linnaeus, 1758). *Galemys*, **13**.
- Rosell, C. & Herrero, J.** (2002). *Sus scrofa* Linnaeus, 1758. Jabalí. En: Atlas de los mamíferos terrestres de España. Eds.: Palomo, L.J. & Gisbert, J. Dirección General de Conservación de la Naturaleza-SECEM-SECEMU. Madrid. Pp:306-309.
- Ross, H.M.; Foster, G.; Reid, R.J.; Jahans, K.L. & MacMillan, A.P.** (1994). *Brucella* species infection in sea-mammals. *Veterinary Record*, **134**:359.
- Rottcher, D.** (1978). Final report, veterinary wildlife research officer, 1975–1978. Zambia Wildlife and National Parks & German Agency for Technical Co-operation (GTZ), Lusaka, Zambia, Pp:87.
- Roug, A.; Swift, P.; Torres, S.; Jones, K. & Johnson, C.K.** (2012). Serosurveillance for livestock pathogens in free-ranging mule deer (*Odocoileus hemionus*). *PLoS One*, **7**:e50600.

- Ruiz-Fons, F.; Vicente, J.; Vidal, D.; Höfle, U.; Villanúa, D.; Gauss, C.; Segalés, J.; Almería, S.; Montoro, V.L. & Gortázar, C. (2006). Seroprevalence of six reproductive pathogens in European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: The effect on wild boar female reproductive performance. *Theriogenology*, **65**:731-743.
- Sachs, R. & Staak, C. (1968). Serological investigation of brucellosis in game animals in Tanzania. *Bulletin of Epizootic Diseases of Africa*, **16**:91-100.
- Sáenz de Buruaga, M.; Lucio, A.J. & Purroy, F.J. (1991). Jabalí (*Sus scrofa*). En: Reconocimiento de Sexo y Edad en Especies Cinegéticas. Gobierno Vasco. Pp:31-33.
- Saergerman, C.; Vo, T.K.; De Waele, L.; Gilson, D.; Bastin, A.; Dubray, G.; Flanagan, P.; Limet, J.N.; Letesson, J.J. & Godfroid, J. (1999). Diagnosis of bovine brucellosis by skin test: conditions for the test and evaluation of its performance. *Veterinary Record*, **145**:214-218.
- Sáez-Royuela, C. & Tellería, J.L. (1986). The increased population of the wild boar (*Sus scrofa* L.) in Europe. *Mammal Review*, **16**:97-101.
- Samartino, L.E. (2002). Brucellosis in Argentina. *Veterinary Microbiology*, **90**:71-80.
- Sandfoss, M.R.; DePerno, C.S.; Betsill, C.W.; Palamar, M.B.; Erickson, G. & Kennedy-Stoskopf, S. (2012). A serosurvey for *Brucella suis*, classical swine fever virus, porcine circovirus type 2, and pseudorabies virus in feral swine (*Sus scrofa*) of eastern North Carolina. *Journal of Wildlife Diseases*, **48**:462-466.
- Santiago-Moreno, J.; Carvajal, A.; Astorga, R.J.; Coloma, M.A.; Toledano-Díaz, A.; Gómez-Guillamon, F.; Salas-Vega, R. & López-Sebastián, A. (2011). Potential impact of diseases transmissible by sperm on the establishment of Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) genome resource banks. *European Journal of Wildlife Research*, **57**:211-216.
- Santiago-Moreno, J.; González-Bulnes, A.; Gómez-Brunet, A. & López-Sebastián, A. (2003). El muflón (*Ovis gmelini musimon*): caracterización funcional y recurso cinegético. Monografías INIA: Ganadera N.2. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Ministerio de Ciencia y Tecnología, Madrid, Pp:217.
- Schiemann, B. & Staak, C. (1971). *Brucella melitensis* in impala (*Aepyceros melampus*). *Veterinary Record*, **88**:344.
- Schlabritz-Loutsevitch, N.E.; Whatmore, A.M.; Quance, C.R.; Koylass, M.S.; Cummins, L.B.; Dick, E.J. Jr.; Snider, C.L.; Cappelli, D.; Ebersole, J.L.; Nathanielsz, P.W. &

- Hubbard, G.B.** (2009). A novel *Brucella* isolate in association with two cases of stillbirth in non-human primates - first report. *Journal of Medical Primatology*, **38**:70-73.
- Scholz, H.C.; Hofer, E.; Vergnaud, G.; Le Fleche, P.; Whatmore, A.M.; Al Dahouk, S.; Pfeffer, M.; Krüger, M.; Cloeckart, A. & Tomaso, H.** (2009). Isolation of *Brucella microti* from mandibular lymph nodes of red foxes, *Vulpes vulpes*, in lower Austria. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, **9**:153-156.
- Scholz, H.C.; Hubálek, Z.; Sedláček, I.; Vergnaud, G.; Tomaso, H.; Al Dahouk, S.; Melzer, F.; Kämpfer, P.; Neubauer, H.; Cloeckart, A.; Maquart, M.; Zygmunt, M.S.; Whatmore, A.M.; Falsen, E.; Bahn, P.; Göllner, C.; Pfeffer, M.; Huber, B.; Busse, H.J. & Nöckler, K.** (2008). *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **58**:375-382.
- Scholz, H.C.; Nöckler, K.; Göllner, C.; Bahn, P.; Vergnaud, G.; Tomaso, H.; Al Dahouk, S.; Kämpfer, P.; Cloeckart, A.; Maquart, M.; Zygmunt, M.S.; Whatmore, A.M.; Pfeffer, M.; Huber, B.; Busse, H.J. & De, B.K.** (2010). *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **60**:801-808.
- Schumaker, B.** (2013). Risks of *Brucella abortus* spillover in the Greater Yellowstone area. *Revue Scientifique et Technique de L'Office International des Epizooties*, **32**:71-77.
- Schumaker, B.A.; Corso, B.A.; Rhyan, J.C.; Philo, L.M.; Salman, M.D. & Gardner, I.A.** (2010). Evaluation of the fluorescence polarization assay for the detection of *Brucella abortus* antibodies in bison in a natural setting. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, **33**:119-125.
- Serrano, E.; Cross, P.C.; Beneria, M.; Ficapal, A.; Curia, J.; Marco, X.; Lavín, S. & Marco, I.** (2011). Decreasing prevalence of brucellosis in red deer through efforts to control disease in livestock. *Epidemiology and Infection*, **139**:1626-1630.
- Sherman, D.M.** (2011). The spread of pathogens through trade in small ruminants and their products. *Revue Scientifique et Technique de L'Office International des Epizooties*, **30**:207-217.
- Sohn, A.H.; Probert, W.S.; Glaser, C.A.; Gupta, N.; Bollen, A.W.; Wong, J.D.; Grace, E.M. & McDonald, W.C.** (2003). Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp. *Emerging Infectious Diseases*, **9**:485-488.

- Soriguer, R.C.; Márquez, F.J. & Pérez, J.M.** (1998). Las translocaciones (introducciones y reintroducciones) de especies cinegéticas y sus efectos medioambientales. *Galemys*, **10**:19-35.
- Sprague, L.D.; Al-Dahouk, S. & Neubauer, H.** (2012). A review on camel brucellosis: a zoonosis sustained by ignorance and indifference. *Pathogens and Global Health*, **106**:144-149.
- Stěrba, F.** (1982). Pathomorphological changes in brucellosis in hares. *Veterinární Medicína*, **27**:437-448.
- Stěrba, F.** (1983). Differential pathomorphologic diagnosis of brucellosis in hares. *Veterinární Medicína*, **28**:293-308.
- Stěrba, F.** (1984). Brucellosis in rabbits induced by an experimental infection with *Brucella suis* germs. *Veterinární Medicína*, **29**:231-244.
- Stěrba, F. & Halacková, M.** (1987). Use of the rose bengal test in the diagnosis of brucellosis in hares. *Veterinární Medicína*, **32**:441-447.
- Stoenner, H.G. & Lackman, D.B.** (1957). A preliminary report on a *Brucella* isolated from the desert wood rat, *Neotoma lepida* Thomas. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **130**:411-412.
- Stoffregen, W.C.; Olsen, S.C. & Bricker, B.J.** (2006). Parenteral vaccination of domestic pigs with *Brucella abortus* strain RB51. *American Journal of Veterinary Research*, **67**:1802-1808.
- Swann, A.I.; Schnurrenberger, P.R.; Brown, R.R. & Garby, C.L.** (1980). *Brucella abortus* isolations from wild animals. *Veterinary Record*, **106**:57.
- Szulowski, K.; Iwaniak, W.; Pilaszek, J.; Truszczyński, M. & Chrobocińska, M.** (1999). The ELISA for the examination of hare sera for anti-*Brucella* antibodies. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*, **22**:33-40.
- Szyfres, B. & González Tomé, J.** (1968). Natural *Brucella* infection in Argentine wild foxes. *Bulletin of the World Health Organization*, **34**:919-923.
- Szyfres, B.; González Tomé, J. & Palacio Mendieta, T.** (1968). Aislamiento de *Brucella suis* de la liebre europea (*Lepus europaeus*) en la Argentina. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*, **65**:441-445.
- Tessaro, S.V. & Forbes, L.B.** (1986). *Brucella suis* biotype 4: a case of granulomatous nephritis in a barren ground caribou (*Rangifer tarandus groenlandicus* L.) with a review of the distribution of rangiferine brucellosis in Canada. *Journal of Wildlife Diseases*, **22**:479-483.

- Teyssou, R.; Morvan, J.; Leleu, J.P.; Roumegou, P.; Goullin, B. & Carteron, B. (1989).** About a case of human brucellosis due to *Brucella suis* biovar-2. *Médecine et Maladies Infectieuses*, **19**:160-161.
- Thoen, C.O.; Enright, M. & Cheville, N.F. (1993).** *Brucella*. En: Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, 2th Edition. Eds.: Gyles, C.L. & Thoen, C.O. Iowa State University Press. Ames. Pp:237-244.
- Thorne, E.T. (2001).** Brucellosis. En: Infectious Diseases of Wild Mammals, 2th Edition. Eds.: Williams, E.S. & Barker I.K. Iowa State University Press. Ames. Pp:372-395.
- Thorne, E.T.; Herriges, J.D. & Reese, A.D. (1991).** Bovine brucellosis in elk: conflicts in the Greater Yellowstone Area. Proceedings of the elk vulnerability symposium, Bozeman, Montana, 10-12 April. Montana State University Press, Pp:296-303.
- Thorpe, B.D.; Sidwell, R.W.; Bushman, J.B.; Smart, K.L. & Moyes, R. (1965).** Brucellosis in wildlife and livestock of west central Utah. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **146**:225-232.
- Thulin, C.G.; Jaarola, M. & Tegelström, H. (1997).** The occurrence of mountain hare mitochondrial DNA in wild brown hares. *Molecular Ecology*, **6**:463-467.
- Thulin, C.G.; Stone, J.; Tegelström, H. & Walker, C.W. (2006).** Species assignment and hybrid identification among Scandinavian hares *Lepus europaeus* and *L. timidus*. *Wildlife Biology*, **12**:29-38.
- Tiller, R.V.; Gee, J.E.; Lonsway, D.R.; Gribble, S.; Bell, S.C.; Jennison, A.V.; Bates, J.; Coulter, C.; Hoffmaster, A.R. & De, B.K. (2010).** Identification of an unusual *Brucella* strain (BO2) from a lung biopsy in a 52 year-old patient with chronic destructive pneumonia. *BMC Microbiology*, **10**:23.
- Torali, F. & Farina, R. (1988).** Methods for the identification of *Brucella* isolates in use at the Animal Pathology Department, University of Pisa, result of eight years of activity. *Annali della facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Pisa*, **41**:227-232.
- Tolari, F.; Meneguz, P.G.; de Meneghi, D.; Rossi, L. & Mancianti, F. (1987).** Indagini sieroepidemiologiche su stambecchi, camosci ed ovini presenti nel Parco Naturale Argentera. *Atti del Convegno Internazionale "Lo Stambecco delle Alpi; realtà attuale e prospettive"* Valdieri, 17-19 de Septiembre de 1987. Pp:83-92. Citado por Ferroglio *et al.*, 2003.
- Treanor, J.J. (2013).** Integrating ecology with management to control wildlife brucellosis. *Revue Scientifique et Technique de L'Office International des Epizooties*, **32**:239-247.

- Tremblé, F.; Pikula, J.; Bandouchova, H. & Horakova, J.** (2007). European brown hare as a potential source of zoonotic agents. *Veterinární Medicína*, **52**:451-456.
- Truong, L.Q.; Kim, J.T.; Yoon, B.I.; Her, M.; Jung, S.C. & Hahn, T.W.** (2011). Epidemiological survey for *Brucella* in wildlife and stray dogs, a cat and rodents captured on farms. *Journal of Veterinary Medical Science*, **73**:1597-1601.
- Tryland, M.; Derocher, A.E.; Wiig, Ø. & Godfroid, J.** (2001). *Brucella* sp. antibodies in polar bears (*Ursus maritimus*) from Svalbard and the Barents Sea. *Journal of Wildlife Diseases*, **37**:523-531.
- Tryland, M.; Kleivane, L.; Alfredsson, A.; Kjeld, M.; Arnason, A. & Godfroid, J.** (1999). Evidence of *Brucella* infection in marine mammals in the North Atlantic Ocean. *Veterinary Record*, **144**:588-592.
- Tunnickliff, E.A. & Marsh, H.** (1935). Bang's disease in bison and elk in the Yellowstone National Park and on the National Bison Range. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **86**:745-752. Citado por Rhyon, 2000.
- Turner, J.C. & Payson, J.B.** (1982). Prevalence of antibodies of selected infectious disease agents in the peninsular desert bighorn sheep (*Ovis canadensis cremnobates*) of the Santa Rosa Mountains, California. *Journal of Wildlife Diseases*, **18**:243-245.
- Ugalde, R.A.** (1999). Intracellular lifestyle of *Brucella* spp. common genes with other animal pathogens, plant pathogens, and endosymbionts. *Microbes and Infection*, **1**:1211-1219.
- Uhart, M.M.; Vila, A.R.; Beade, M.S.; Balcarce, A. & Karesh, W.B.** (2003). Health evaluation of pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus celer*) at Campos del Tuyú Wildlife Reserve, Argentina. *Journal of Wildlife Diseases*, **39**:887-893.
- van der Leek, M.L.; Becker, H.N.; Humphrey, P.; Adams, C.L.; Belden, R.C.; Frankenberger, W.B. & Nicoletti, P.L.** (1993). Prevalence of *Brucella* sp. antibodies in feral swine in Florida. *Journal of Wildlife Diseases*, **29**:410-415.
- Van Houten, C.K.; Lee Belden, E.; Kreeger, T.J.; Williams, E.S.; Edwards, W.H.; Thorne, E.T.; Cook, W.E. & Mills, K.W.** (2003). Validation of a *Brucella abortus* competitive enzyme-linked immunosorbent assay for use in Rocky Mountain elk (*Cervus elaphus nelsoni*). *Journal of Wildlife Diseases*, **39**:316-322.
- Velasco, J.; Bengoechea, J.A.; Brandenburg, K.; Lindner, B.; Seydel, U.; González, D.; Zähringer, U.; Moreno, E. & Moriyón, I.** (2000). *Brucella abortus* and its closest phylogenetic relative, *Ochrobactrum* spp., differ in outer membrane permeability and cationic peptide resistance. *Infection and Immunity*, **68**:3210-3218.

- Vengust, G.; Valencak, Z. & Bidovec, A. (2006). A serological survey of selected pathogens in wild boar in Slovenia. *Journal of Veterinary Medicine*, **53**:24-27.
- Verger, J.M.; Grimont, F.; Grimont, P.A. & Grayon, M. (1985). *Brucella*: a monoespecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **35**:292-295.
- Vershilova, P.A.; Liamkin, G.; Malikov, V.E.; Dranovskaya, E.A. & Taran, I.F. (1983). *Brucella* strains from mouselike rodents in southwestern USSR. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **33**:399-400.
- Vicente, J.; Höfle, U.; Garrido, J.M.; Fernández-de-Mera, I.G.; Juste, R.; Barral, M. & Gortázar, C. (2006). Wild boar and red deer display high prevalences of tuberculosis-like lesions in Spain. *Veterinary Research*, **37**:107-119.
- Vicente, J.; León-Vizcaíno, L.; Gortázar, C.; Cubero, M.J.; González, M. & Martín-Atance, P. (2002). Antibodies to selected viral and bacterial pathogens in European wild boars from southcentral Spain. *Journal of Wildlife Diseases*, **38**:649-652.
- Vítovec, J.; Vladík, P.; Záhor, Z. & Slabý, V. (1976). Morphological study of 70 cases of brucellosis in rabbits caused by *Brucella suis*. *Veterinárni Medicína*, **21**:359-368.
- Vizcaíno, N.; Verger, J.M.; Grayon, M.; Zygmunt, M.S. & Cloeckaert, A. (1997). DNA polymorphism at the omp-31 locus of *Brucella* spp.: evidence for a large deletion in *Brucella abortus*, and other species-specific markers. *Microbiology*, **143**:2913-2921.
- Waghela, S. & Karstad, L. (1986). Antibodies to *Brucella* spp. among blue wildebeest and African buffalo in Kenya. *Journal of Wildlife Diseases*, **22**:189-192.
- Wanke, M.M. (2004). Canine brucellosis. *Animal Reproduction Science*, **82-83**:195-207.
- Watarai, M.; Ito, N.; Omata, Y. & Ishiguro, N. (2006). A serological survey of *Brucella* spp. in free-ranging wild boar (*Sus scrofa leucomystax*) in Shikoku, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, **68**:1139-1141.
- Wattam, A.R.; Williams, K.P.; Snyder, E.E.; Almeida, N.F.Jr.; Shukla, M.; Dickerman, A.W.; Crasta, O.R.; Kenyon, R.; Lu, J.; Shallom, J.M.; Yoo, H.; Ficht, T.A.; Tsolis, R.M.; Munk, C.; Tapia, R.; Han, C.S.; Detter, J.C.; Bruce, D.; Brettin, T.S.; Sobral, B.W.; Boyle, S.M. & Setubal, J.C. (2009). Analysis of ten *Brucella* genomes reveals evidence for horizontal gene transfer despite a preferred intracellular lifestyle. *Journal of Bacteriology*, **191**:3569-3579.
- Wazed Ali Mollah, M. & McKinney, P.A. (2002). Brucellosis and suspected paratuberculosis in a nubian ibex (*Capra ibex nubiana*) - a case report. *Proceedings of*

the World Association of Wildlife Veterinarians Wildlife Sessions at the 27th World Veterinary Congress in Tunisia.

- Weber, E.** (2004). El Rebeco Norteño y Meridional. Ediciones Omega, S.A. Pp:196.
- Whatmore, A.M.** (2009). Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. *Infection, Genetics and Evolution*, **9**:1168-1184.
- Whatmore, A.M.; Dawson, C.E.; Groussaud, P.; Koylass, M.S.; King, A.C.; Shankster, S.J.; Sohn, A.H.; Probert, W.S. & McDonald, W.L.** (2008). Marine mammal *Brucella* genotype associated with zoonotic infection. *Emerging Infectious Diseases*, **14**:517-518.
- Whatmore, A.M.; Perrett, L.L. & MacMilan, A.P.** (2007). Characterization of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing. *BMC Microbiology*, **7**:34.
- White, P.J.; Treanor, J.J.; Geremia, C.; Wallen, R.L.; Blanton, D.W. & Hallac, D.E.** (2013). Bovine brucellosis in wildlife: using adaptive management to improve understanding, technology and suppression. *Revue Scientifique et Technique de L'Office International des Epizooties*, **32**:263-270.
- Wibbelt, G. & Frölich, K.** (2005). Infectious diseases in the European brown hare (*Lepus europaeus*). *Wildlife Biology in Practice*, **1**:86-93.
- Williams, E.S.; Thorne, E.T.; Anderson, S.L. & Herriges, J.D. Jr.** (1993). Brucellosis in free-ranging bison from Teton County, Wyoming. *Journal of Wildlife Diseases*, **29**:118-122.
- Winkelmayer, R.; Vodnansky, M.; Paulsen, P.; Gansterer, A. & Treml, F.** (2005). Explorative study on the seroprevalence of *Brucella*-, *Francisella*- and *Leptospira* antibodies in the European hare (*Lepus europaeus* Pallas) of the Austrian - Czech border region. *Veterinary Medicine Austria*, **92**:131-135.
- Woldemeskel, M.** (2013). Zoonosis due to *Bruella suis* with special reference to infection in dogs (Carnivores): A brief review. *Open Journal of Veterinary Medicine*, **3**:213-221.
- Wood, G.W.; Hendricks, J.B. & Goodman, D.E.** (1976). Brucellosis in feral swine. *Journal of Wildlife Diseases*, **12**:579-582.
- Wu, N.; Abril, C.; Hinić, V.; Brodard, I.; Thür, B.; Fattebert, J.; Hüsey, D. & Ryser-Degiorgis, M.P.** (2011). Free-ranging wild boar: a disease threat to domestic pigs in Switzerland? *Journal of Wildlife Diseases*, **47**:868-879.
- Wu, N.; Abril, C.; Thomann, A.; Grosclaude, E.; Doherr, M.G.; Boujon, P. & Ryser-Degiorgis, M.P.** (2012). Risk factors for contacts between wild boar and outdoor

- pigs in Switzerland and investigations on potential *Brucella suis* spill-over. *BMC Veterinary Research*, **8**:116.
- Wyckoff, A.C.; Henke, S.E.; Campbell, T.A.; Hewitt, D.G. & VerCauteren, K.C.** (2009). Feral swine contact with domestic swine: a serologic survey and assessment of potential for disease transmission. *Journal of Wildlife Diseases*, **45**:422-429.
- Yagupsky, P.** (1999). Detection of *Brucella* in blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, **37**:3437-3442.
- Yagupsky, P. & Baron, E.J.** (2005). Laboratory exposures to *Brucellae* and implications for bioterrorism. *Emerging Infectious Diseases*, **11**:1180-1185.
- Youatt, W.G. & Fay, L.D.** (1959). Experimental brucellosis in white-tailed deer. *American Journal of Veterinary Research*, **20**:925-926.
- Yu, W.L. & Nielsen, K.** (2010). Review of detection of *Brucella* spp. by polymerase chain reaction. *Croatian Medical Journal*, **51**:306-313.
- Zarnke, R.L.** (1983). Serologic survey for selected microbial pathogens in Alaskan wildlife. *Journal of Wildlife Diseases*, **19**:324-329.
- Zarnke, R.L.** (2000). Alaska Wildlife Serologic Survey, 1975–2000. Alaska Department of Fish and Game. Federal Aid in Wildlife Restoration. Research Final Report. Juneau, Alaska. Pp:28.
- Zarnke, R.L.; Ver Hoef, J.M. & DeLong, R.A.** (2006). Geographic pattern of serum antibody prevalence for *Brucella* spp. in caribou, grizzly bears, and wolves from Alaska, 1975-1998. *Journal of Wildlife Diseases*, **42**:570-577.
- Zarnke, R.L. & Yuill, T.M.** (1981). Serologic survey for selected microbial agents in mammals from Alberta, 1976. *Journal of Wildlife Diseases*, **17**:453-461.
- Zheludkov, M.M. & Tsirelson, L.E.** (2010). Reservoirs of *Brucella* infection in nature. *Biology Bulletin*, **37**:709-715.
- Zotova, A.A. & Balditsina, K.S.** (1943). Experimental infection of ticks with brucellosis under laboratory conditions. *Translated from the Bulletin of the Kazakhstan Branch of the Academy of Sciences, USSR*, **2**:48-49.
- Zygmunt, M.S.; Cloeckert, A. & Dubray, G.** (1994). *Brucella melitensis* cell envelope protein and lipopolysaccharide epitopes involved in humoral immune responses of naturally and experimentally infected sheep. *Journal of Clinical Microbiology*, **32**:2514-2522.
- Zygmunt, S.M.; Nettles, V.F.; Shotts, E.B. Jr.; Carmen, W.A.; Blackburn, B.O.** (1982). Brucellosis in wild swine: a serologic and bacteriologic survey in the southeastern

United States and Hawaii. *Journal of the American Veterinary Medical Association*,
181:1285-1287.

PÁGINAS WEB

10.- PÁGINAS WEB

RASVE, 2011

http://rasve.marm.es//Publica/Programas/NORMATIVA%20Y%20PROGRAMAS%5CPROGRAMAS%5CFAUNA%20SILVESTRE%5CPLAN%20NACIONAL%20DE%20VIGILANCIA%20SANITARIA%20EN%20FAUNA%20SILVESTRE_2011.PDF. Consulta el 10/04/2013

RASVE, 2013

<http://rasve.mapa.es/publica/programas/NORMATIVA%20Y%20PROGRAMAS%5CPROGRAMAS%5C2013%5CBRUCELOSIS%20OVINA%20Y%20CAPRINA%5CPROGRAMA%20BOC%202013.PDF>. Consulta el 10/11/2013

MAAM, 2012

http://www.magrama.gob.es/estadistica/pags/anuario/2012/AE_2012_Completo.pdf.
Consulta el 12/11/2013

ÍNDICE DE TABLAS

11.- ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: <i>Número de jabalíes muestreados y muestras tomadas en las diferentes comarcas.</i>	51
Tabla 2: <i>Número de muestras de liebres por comarcas.</i>	60
Tabla 3: <i>Número y procedencia de muestras de liebres de otras regiones.</i>	61
Tabla 4: <i>Número y procedencia de perros de caza por comarca.</i>	70
Tabla 5: <i>Número de jabalíes seropositivos en las diferentes temporadas de caza.</i>	75
Tabla 6: <i>Distribución de la seroprevalencia de brucelosis en jabalí en las diferentes comarcas estudiadas.</i>	76
Tabla 7: <i>Distribución de la seroprevalencia según el sexo.</i>	78
Tabla 8: <i>Distribución de la seroprevalencia según la edad.</i>	78
Tabla 9: <i>Distribución de la seroprevalencia de brucelosis en función de la edad y sexo de los jabalíes analizados.</i>	78
Tabla 10: <i>Distribución de la frecuencia de aislamientos de B. suis biovar 2 por temporada de caza.</i>	79
Tabla 11: <i>Número de cultivos de jabalí y frecuencia de aislamiento por comarca.</i>	80
Tabla 12: <i>Frecuencia de aislamiento de B. suis biovar 2 en función del sexo de los jabalíes examinados.</i>	82
Tabla 13: <i>Frecuencia de aislamiento de B. suis biovar 2 en función de la edad de los jabalíes examinados.</i>	82
Tabla 14: <i>Frecuencia de aislamiento de B. suis biovar 2 en función de la edad y sexo de los jabalíes examinados.</i>	82
Tabla 15: <i>Frecuencia de aislamiento de B. suis biovar 2 en jabalíes en función de la toma de muestra.</i>	83
Tabla 16: <i>Frecuencia de aislamiento de B. suis biovar 2 en jabalíes en función del tipo de tejido analizado.</i>	83
Tabla 17: <i>Frecuencia de aislamiento de B. suis biovar 2 en jabalíes en función del número de tejidos analizados.</i>	84
Tabla 18: <i>Distribución de los haplotipos de B. suis biovar 2 en función de la temporada de caza.</i>	87
Tabla 19: <i>Distribución de los haplotipos de B. suis biovar 2 en función del sexo de los jabalíes estudiados.</i>	87

Tabla 20: <i>Distribución de los haplotipos de B. suis biovar 2 en función de la edad de los jabalíes.</i>	88
Tabla 21: <i>Resultados obtenidos en los jabalíes encontrados muertos.</i>	91
Tabla 22: <i>Distribución de los perros seropositivos en la prueba de rosa de Bengala modificada (RBTm) y estándar (RBTest) en las diferentes comarcas en las que se pudo obtener muestras. ...</i>	96
Tabla 23: <i>Resultados obtenidos en las pruebas de rosa de Bengala estándar (RBTest) y modificada (RBTm), en función del sexo y edad de los perros.</i>	98
Tabla 24: <i>Resultados obtenidos en las pruebas de rosa de Bengala estándar (RBTest) y modificada (RBTm), en función del tipo de alimentación de los perros.</i>	98
Tabla 25: <i>Características más relevantes de los perros que fueron encontrados positivos en la prueba de rosa de Bengala estándar (RBTest).....</i>	99
Tabla 26: <i>Características más relevantes de los perros sometidos a hemocultivo.....</i>	100

ÍNDICE DE FIGURAS

12.- ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mapa comarcal de la Comunidad Autónoma de Aragón.....	45
Figura 2: Imágenes de la toma de muestras de jabalí en campo.	49
Figura 3: Número de jabalíes muestreados por temporada de caza.	50
Figura 4: Número de sueros de jabalí obtenidos por temporada de caza.	52
Figura 5: Imágenes de la toma de muestras de liebre en campo.	58
Figura 6: Distribución comarcal de muestras de liebre en Aragón.	59
Figura 7: Distribución comarcal de muestras de perro en Aragón.	69
Figura 8: Número de sueros de perros de caza obtenidos por año.	70
Figura 9: Distribución espacial de seroprevalencias en las comarcas de Aragón.....	77
Figura 10: Distribución espacial de frecuencias de aislamiento en las comarcas de Aragón.	81
Figura 11: “Bruce-ladder” PCR multiplex. Línea 1, marcador de pesos moleculares de 100pb (Invitrogen Ltd.); línea 2, <i>B. abortus</i> biovar. 1 (cepa 2308); línea 3, <i>B. melitensis</i> biovar. 1 (cepa 16M); línea 4, <i>B. ovis</i> (cepa PA); línea 5, <i>B. suis</i> biovar. 1 (cepa 1330); línea 6 <i>B. canis</i> (cepa 6/66); línea 7 <i>B. canis</i> (cepa de campo); línea 8, <i>B. abortus</i> S19 (vacuna); línea 9, <i>B. abortus</i> RB51 (vacuna); línea 10, <i>B. melitensis</i> Rev.1 (vacuna); línea 11, <i>B. neotomae</i> (cepa SK33); línea 12, <i>B. pinipedialis</i> (cepa B2/94); línea 13, <i>B. ceti</i> (cepa B1/94); línea 14, <i>B. microti</i> (cepa 4915); línea 15, <i>B. inopinata</i> (cepa BO-01).....	85
Figura 12: PCR multiplex “Suis ladder”. Línea 1, marcador de pesos moleculares de 100pb (Invitrogen Ltd.); línea 2, <i>B. suis</i> biovar 1 (cepa 1330); línea 3, <i>B. suis</i> biovar 2 (cepa Thomsen); línea 4, <i>B. suis</i> biovar 3 (cepa 686); línea 5, <i>B. suis</i> biovar 4 (cepa 40); línea 6, <i>B. suis</i> biovar 5 (cepa 513).	85
Figura 13: PCR multiplex “Suis ladder”. Línea 1, marcador de pesos moleculares de 100pb (Invitrogen Ltd.); línea 2, <i>B. suis</i> biovar 1 (cepa de referencia 1330, usada como control); línea 3, <i>B. suis</i> biovar 2 (cepa de referencia Thomsen, usada como control); líneas 4 a 14, cepas de campo representativas aisladas de jabalíes de nuestro estudio, e identificadas en todos los casos como <i>B. suis</i> biovar 2; línea 15, control negativo (H ₂ O).....	86
Figura 14: Patrones de restricción identificados para las cepas de <i>B. suis</i> biovar 2 tras amplificación mediante PCR de los genes de proteínas de la membrana externa (<i>Omp2a</i> , <i>Omp2b</i> y <i>Omp31</i>) y posterior digestión de los mismos con la enzimas de restricción indicadas (PCR-RFLP). Línea 1, marcador de pesos moleculares de 100 pb (Invitrogen Ltd.); línea 2, patrón característico de la cepa <i>B. suis</i> biovar 2 de referencia (Thomsen), aislado en jabalíes, liebres europeas y cerdos domésticos en varios países europeos, pero nunca aislado en España; línea 3, patrón característico del haplotipo centroeuropeo de <i>B. suis</i> biovar 2, aislado en jabalíes y cerdos domésticos en varios países de Europa, incluyendo España (este haplotipo también se ha encontrado en liebres europeas	

en algunos países europeos, pero nunca en liebres españolas); línea 4, patrón característico del haplotipo ibérico mayoritario de *B. suis* biovar 2, aislado exclusivamente de jabalíes y cerdos domésticos en la península ibérica, y nunca aislado en los restantes países europeos; línea 5, patrón característico del haplotipo ibérico minoritario de *B. suis* biovar 2, aislado también exclusivamente en jabalíes y cerdos de la península ibérica, y nunca aislado en los restantes países europeos. Línea 6, patrón identificado exclusivamente en cepas aisladas de liebre europea del noreste de España y sur de Francia..... 86

Figura 15: Distribución de los haplotipos ibérico mayoritario y centroeuropeo en las comarcas de Aragón. 89

Figura 16: Testículo y epidídimo del único jabalí en el que se evidenciaron alteraciones macroscópicas en el momento de la toma de muestras, y que resultó infectado por *B. suis* biovar 2. 90

Figura 17: Histología (H-E) e IHQ del epidídimo. 91

Figura 18: Epidídimo de un jabalí infectado por *B. suis* biovar 2, presentando zonas aclaradas, fibrosadas y pus..... 92

Figura 19: Media y desviación estándar (barras perpendiculares) de las densidades ópticas (DO) obtenidas en el iELISA con diferentes concentraciones de las 3 proteínas recombinantes (proteína G: panel superior; proteína AG: panel central; proteína A: panel inferior) ensayadas como conjugado, y diferentes diluciones de los sueros positivos (n=20) y negativos (n=11). 93

Figura 20: Distribución de las medias de densidad óptica (DO) de los sueros de las liebres usadas como control positivo (n=20) y control negativo (n=11), y analizadas mediante el iELISA en las condiciones óptimas (dilución de suero al 1/50 y proteína A -0,2 µg/ml- como conjugado). La barra horizontal representa el punto de corte (40% de DO con respecto al suero control) seleccionado para el estudio definitivo de determinación de la seroprevalencia en muestras de campo. 94

Figura 21: Distribución de las medias de densidad óptica (DO) de los sueros de la totalidad de liebres analizadas mediante el iELISA en Aragón. La barra horizontal representa el punto de corte a partir del que los valores de DO se consideran positivos. 95

Figura 22: Distribución comarcal de los perros seropositivos en la prueba de rosa de Bengala modificada (mapa de la izquierda) y prueba de rosa de Bengala estándar (mapa de la derecha), en las diferentes comarcas en las que se pudo obtener muestras. 97

ABREVIATURAS

13.- ABREVIATURAS

ABTS:	2,2'-Azinodi-[3-etilbenzotiazolín sulfonato].
Ac:	Anticuerpo.
ADN:	Ácido desoxirribonucleico.
Ag:	Antígeno.
APNs:	Agentes de Protección de la Naturaleza del Gobierno de Aragón.
BAB:	Medio de agar sangre (<i>Blood Agar Base</i>).
BSA:	Albúmina de suero bovino.
cc.ss:	Cotos sociales.
cELISA:	ELISA de competición.
CFT:	Técnica de fijación del complemento.
CITA:	Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón.
DO:	Densidad óptica.
ELISA:	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>).
FPA:	Técnica de polarización fluorescente (<i>Flourescence Polarization Assay</i>).
FVUZ:	Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza.
Gram:	Tinción de Gram.
H-E:	Hematoxilina-Eosina.
IC:	Intervalo de confianza.
iELISA:	ELISA indirecto.
IFN-γ:	Gamma interferón.
Ig:	Inmunoglobulina.
IHQ:	Inmunohistoquímica.
INAGA:	Instituto Aragonés de Gestión Ambiental.
INIA:	Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria.
LPS:	Lipopolisacárido.

LPS-S:	Lipopolisacárido liso.
MF:	Medio de Farrell.
MLVA:	(<i>Multiple Loci VNTR Analysis</i>).
mTM:	Medio Thayer-Martin modificado.
NH:	Hapteno nativo.
PC:	Punto de corte.
PBS:	Tampón fosfato salino.
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).
PNY:	Parque Nacional de Yellowstone.
OMP:	Proteínas de membrana externa (<i>Outer Membrane Proteins</i>).
O/PS:	El polisacárido O.
RBTest:	La técnica estándar de aglutinación rápida con antígeno rosa de Bengala.
RBTm:	La técnica modificada de aglutinación rápida con antígeno rosa de Bengala.
rr.cc:	Reservas de caza.
RFLPs:	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>).
SAT:	Seroaglutinación lenta en tubo (<i>Serum Agglutination Test</i>)
SM:	Suspensión madre.
SNP:	Polimorfismo de un solo nucleótido (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>).
TBS:	Solución salina tamponada con Tris.
TBE:	Solución salina tamponada con Tris, borato y EDTA.
TSB:	Medio de cultivo caldo de tripticasa de soja.
UFC:	Unidades formadoras de colonias.
VNTR:	Número variable de repeticiones en tándem (<i>Variable Number of Tandem Repeats</i>).

