

Brote de abortos por *Brucella suis* en granja porcina de Buenos Aires (Argentina)

Micheloud, J.F.^{1*}, Perez, M.², Margineda, C.A.², Salomon Buffa, M.³, Morell, E.⁴, Paolicchi, F.⁵, Fiorentino, M.A.⁵ y Campero, C.⁴

1. Servicio de Diagnóstico Veterinario Especializado. INTA EEA Salta, Grupo de Sanidad Animal. RN 68, km 172 (4403) Cerrillos, Salta.
2. Servicio de Diagnóstico Veterinario Especializado, 4 Laboratorio de Patología, 5. Laboratorio de Bacteriología. EEA Balcarce – INTA. Ruta Nacional 226 Km 73,5 (7620) Balcarce, Buenos Aires, Argentina.
3. Veterinaria. Actividad Privada.

*Correo electrónico: jmicheloud@correo.inta.gov.ar

No existe conflicto de intereses

Palabras clave

Aborto, *Brucella suis*, cerdos.

Keywords

Abortion, *Brucella suis*, swine.

RESUMEN

La brucelosis por *Brucella suis* es una enfermedad infecto-contagiosa que produce grandes pérdidas económicas en la industria porcina y tiene gran impacto sobre la salud pública por tratarse de una zoonosis. Aquí se describe un brote de brucelosis en un criadero intensivo de cerdos en la provincia de Buenos Aires. Se sangraron todos los animales de la piara para realizar las pruebas de Antígeno bufferado en Placa (BPA), test de aglutinación en tubo (SAT) y 2-Mercaptoetanol (2-ME) y se efectuó el estudio histopatológico, inmunohistoquímico y microbiológico de las muestras de tejidos obtenidos de la necropsia de uno de los fetos abortados y su placenta. La incidencia de abortos alcanzó el 4,2% y el 32% de animales fueron seropositivos. En el feto y la placenta no se observaron lesiones macroscópicas, histológicamente se evidenció la presencia de neumonía intersticial y placentitis linfoplasmocítica. Se aisló *B. suis* del contenido estomacal, pulmón fetal y placenta. Mediante inmunohistoquímica se detectaron antígenos de *Brucella* spp. en el tejido pulmonar. Estos hallazgos permiten concluir la presencia de infección activa por *B. suis*. Si bien la enfermedad es conocida por los productores frecuentemente es subestimada y no se aplican las medidas necesarias para evitar su ingreso a las piaras comerciales.

SUMMARY

Abortion outbreak due to *Brucella suis* in a swine farm in the province of Buenos Aires (Argentina).

Brucellosis is an infectious disease that causes great economic losses in the porcine industry and has a great impact on public health due to its zoonotic potential. This article describes an outbreak of brucellosis in an intensive pig farm. All animals in the herd were bled for examination and the sera were subjected to Buffered Plate Antigen (BPA), Standard Agglutination Test (SAT) and 2-Mercaptoetanol tests (2-ME). We performed the necropsy on one of the aborted fetuses and placenta. The obtained samples were subjected to microbiological, histopathological and immunohistochemical studies. The incidence of abortions reached the 4.2% and 32% of animals were seropositive. There were no significant gross lesions in the fetus or placenta but, microscopically they evidenced mononuclear placentitis and interstitial pneumonia. *Brucella suis* was isolated from fetal lung, stomach contents and placenta. Immunopositivity for *Brucella* spp. was detected in fetal lung tissue by immunohistochemistry. These findings allow us to conclude the presence of active infection with *B. suis* in the herd. Despite the fact that the disease is known by swine producers, it is often underestimated and the necessary measures to prevent the spread of the disease in commercial herds are not applied.

Introducción

La brucelosis es una enfermedad infecto-contagiosa de distribución mundial que afecta tanto a animales domésticos como silvestres y al hombre^{15, 22}. *Brucella suis* es el agente causal de la brucelosis porcina^{3, 21, 24}. Esta enfermedad puede ser un problema serio pero no reconocido actualmente en muchos países²¹. En Argentina no existe un programa de control para la brucelosis porcina y su verdadera situación epidemiológica es desconocida⁹. Existen 5 biovariedades de *B. suis* aunque solo la 1, 2 y 3 son capaces de infectar a cerdos²⁸, siendo las biovariedades 1

y 3 las más específicas de esta especie zoonóticas²¹. La manifestación inicial más importante de la brucelosis en una piara son los abortos y el incremento de la mortalidad perinatal^{3, 6, 21}. En los machos puede producir orquitis y eventualmente afectar las glándulas sexuales accesorias^{6, 21}, siendo la eliminación seminal frecuente, incluso en ausencia de signos clínicos^{2, 18}. La enfermedad se transmite por el material infeccioso de los abortos, las secreciones uterinas o el semen infectado^{6, 21}. La principal vía de infección es la oral, por la ingestión de fetos abortados, loquios y alimentos contaminados²¹. En la difusión de la enfermedad adqui-

ere importancia la transmisión venérea siendo el empleo de semen contaminado una fuente importante de infección, tanto en el servicio natural como en la inseminación artificial (IA)². Las hembras infectadas pueden transmitir verticalmente la infección a sus lechones por vía transplacentaria o galactófora³. Si bien la infección en estos casos suele ser temporal, algunos animales pueden permanecer infectados transformándose en portadores crónicos¹. La infección por *B. suis* puede propagarse de un animal infectado al 50% de los animales de la piara en pocos meses pudiendo llegar la tasa de infección hasta el 80%^{7, 30}. El período de

incubación de la enfermedad es relativamente largo y depende del estado fisiológico de los animales¹². En zonas endémicas, la infección puede presentarse en forma subclínica por lo que sin un monitoreo serológico previo, la enfermedad en la piara puede pasar desapercibida durante mucho tiempo²¹. La erradicación de la brucelosis del establecimiento requiere de la identificación de los animales enfermos, su progresiva eliminación y el reemplazo con animales no infectados^{3,10}.

En este artículo se describe un brote de abortos producido por *Brucella suis* biovar 1 en un criadero de cerdos intensivo de la provincia de Buenos Aires.

Materiales y métodos

Antecedentes

El brote ocurrió en un establecimiento ubicado en el partido de General Pueyrredón en la provincia de Buenos Aires, que contaba con un plantel de 118 hembras híbridas en producción y 6 padrillos en servicio natural. En la maternidad las hembras eran mantenidas en jaulas individuales sobre piso de cemento. Los padrillos eran mantenidos en boxes individuales donde las hembras eran conducidas durante el servicio. Los animales ingerían un alimento balanceado comercial, elaborado a base de grano de maíz, expeler de soja, afrechillo y un núcleo vitamínico-mineral. El agua se administraba mediante un sistema de chupetes individuales. Todo el plantel recibía una

dosis de vacunas para prevenir la leptospirosis y la parvovirus pre-servicio.

Necropsia

A requerimiento del productor el Servicio de Diagnóstico Veterinario Especializado del INTA Balcarce procesó un feto de aproximadamente 75-100 días de gestación y su placenta. Durante la necropsia se recolectaron muestras de tejidos para análisis bacteriológico, histopatológico e inmunohistoquímica.

Cultivo bacteriológico

Las muestras de pulmón, contenido estomacal y placenta fueron cultivadas en placas agar Sangre Columbia (ASC) (Oxoid Ltd, Wad Road, Basingstoke, UK) con 5% de sangre bovina desfibrinada estéril, agar Skirrow con antibióticos (ASK) 31 y agar McConkey (MC). Las placas de ASC se incubaron en atmósfera con 10% CO₂, las de ASK en microaerofilia y las de MC en aerobiosis. La temperatura empleada en todos los casos fue de 37 °C y los tiempos de incubación fueron de 24h, 48h y 7 días para las placas MC, ASC o ASK, respectivamente. Los aislamientos bacteriológicos obtenidos fueron identificados hasta género por las técnicas microbiológicas de rutina³ y posteriormente enviados al Instituto Carlos G. Malbrán para la identificación de especie y su tipificación. Todos los procedimientos de laboratorio se realizaron en una cabina de seguridad biológica tipo A II en un laboratorio con nivel de bioseguridad 2.

Histología e inmunohistoquímica

Las muestras de pulmón, encéfalo, ganglios linfáticos, corazón, timo, riñón, hígado, bazo, adrenal y placenta fueron fijadas en formol 10%, deshidratadas y embebidas en parafina en forma rutinaria. Posteriormente las secciones de 4-5 µm fueron coloreadas con hematoxilina-eosina. Se registraron los cambios histológicos y se clasificaron las lesiones. Los cortes de pulmón fueron además examinados mediante la técnica de avidina biotina (ABC), siguiendo una metodología ya descrita²⁰. Para ello se utilizó un anticuerpo primario policlonal (antisuero *B. abortus*, Difco Lab., Detroit, Michigan, USA) a la dilución 1:200, incubado durante 45 min a 37° C con tejidos controles positivos y negativos.

Serología

Se obtuvieron muestras de sangre entera por punción de la vena auricular. Las muestras fueron centrifugadas y los sueros separados en alícuotas de 2 mL. Para la detección de anticuerpos anti-*Brucella* se realizaron las pruebas de antígeno bufferado en placa (BPA), seroaglutinación lenta en tubo (SAT), 2-mercaptoetanol (2-ME)²⁵. La prueba de BPA fue realizada siguiendo las recomendaciones de SENASA⁵. Los resultados fueron expresados como positivos o negativos. Las pruebas de SAT y 2-ME fueron realizadas en paralelo como describen Alton *et al*⁴. Los sueros con títulos $\geq 1:100$ a SAT y/o cualquier reacción en la prueba de 2-ME fueron considerados positivos.

Figura 1.

Microfotografía de pulmón porcino con neumonía intersticial mixta, con abundante celularidad en el intersticio del órgano (flecha) e hiperemia (40X, H/E).

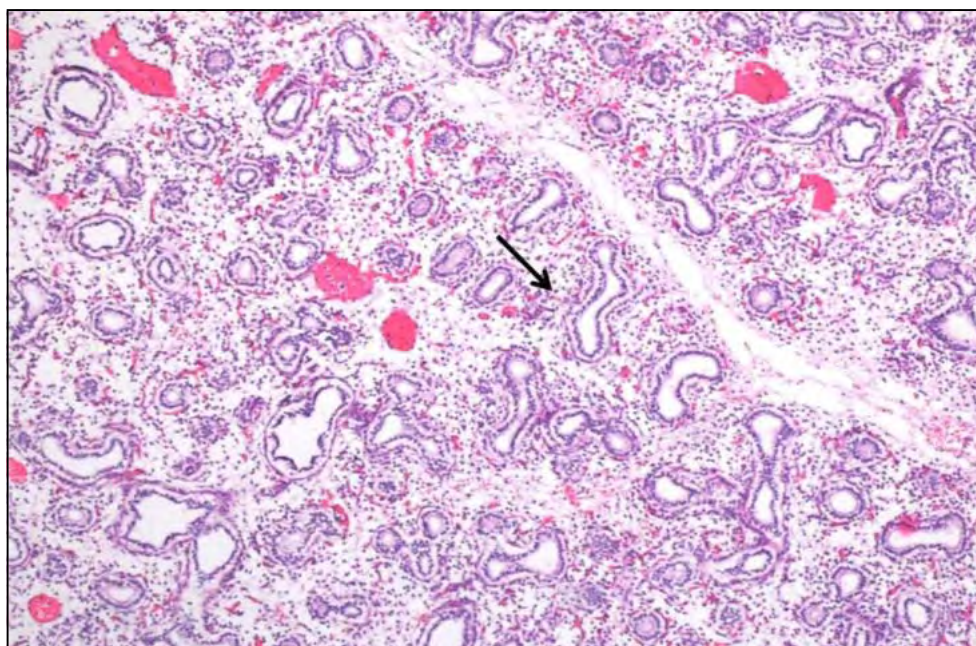


Figura 2.

Microfotografía de placenta porcina. Se observa placentitis linfoplasmocítica severa con importante infiltrado mononuclear (flechas) en el corion e invasión bacteriana por la autólisis (*) (40X, H/E).

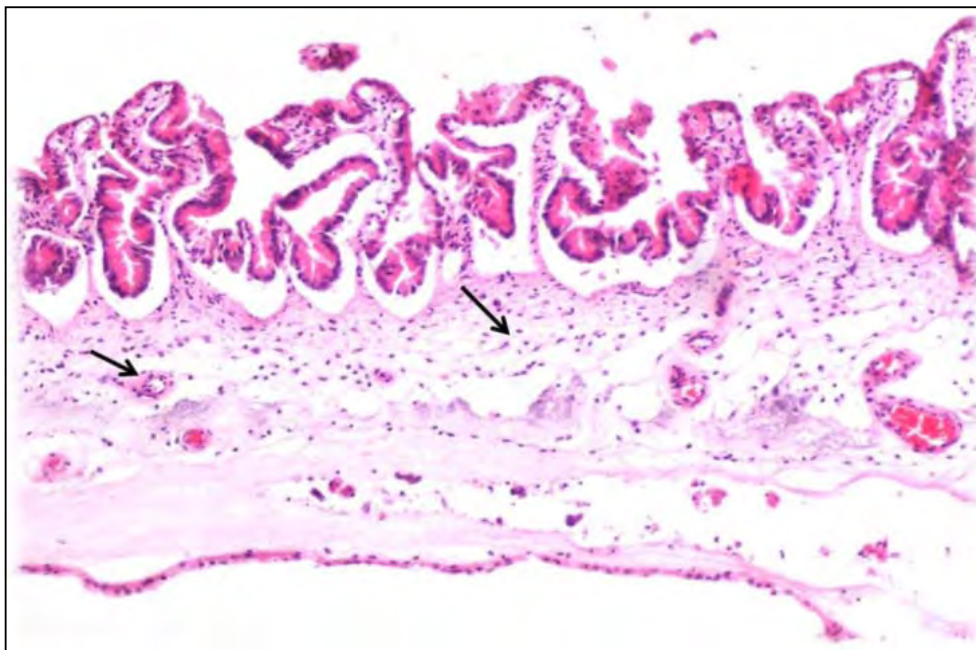
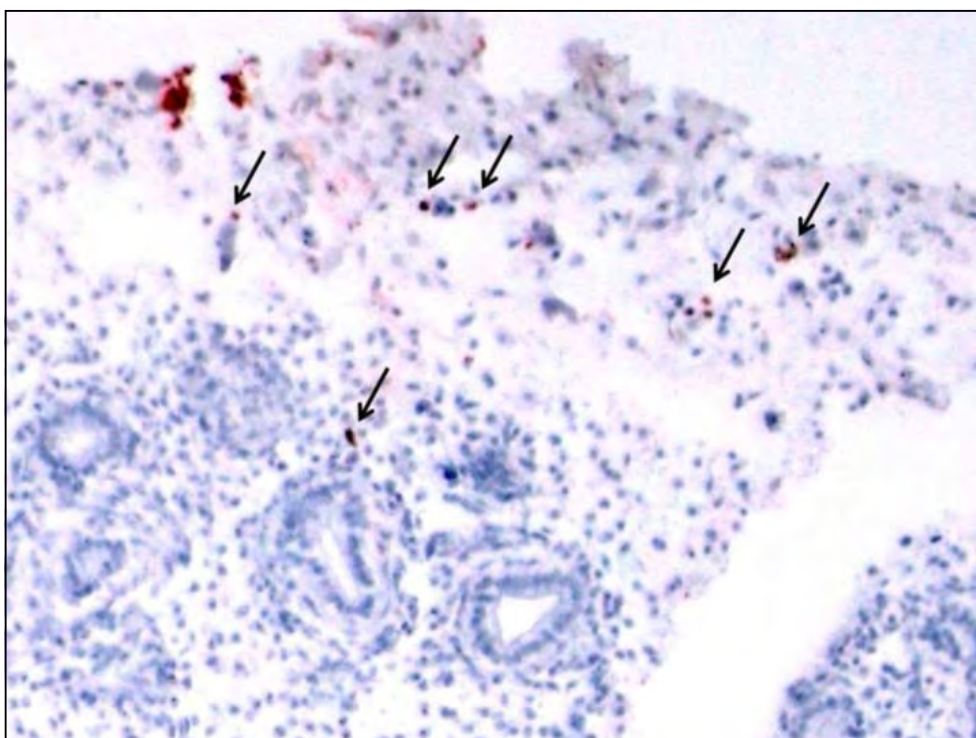


Figura 3.

Microfotografía de sitios de inmunomarcación antigénica de *Brucella* spp. detectados por inmunohistoquímica en pleura pulmonar (flechas) (ABC, 100X).



Resultados

El episodio de abortos afectó a 5 cerdas (4,2%) adultas (de 2ª a 5ª parición) de las 118 existentes en el término de un mes. Ninguna de las hembras afectadas manifestó signología previa a los abortos y no se registró retención de placenta. Se obtuvo el aislamiento en pureza de *B. suis* de los cultivos de contenido estomacal, pulmón fetal y placenta materna. Los aislamientos obtenidos fueron tipificados como *B. suis* biovar 1-A por el servicio de brucelosis del Instituto de salud "Dr. Carlos G. Malbrán", Buenos Aires, Argentina. No se observaron alteraciones macroscópicas a la necropsia fetal aunque sí severa autólisis. Los principales hallazgos microscópicos fueron: neumonía intersticial mixta (Figura 1) caracterizada por infiltrado de linfocitos y macrófagos a nivel de los septos inter-alveolares y áreas focalizadas del parénquima con abundantes polimorfonucleares neutrófilos. Se observó además pericarditis linfocitaria con abundante infiltrado celular mononuclear entre las fibras colágenas del tejido y placentitis linfoplasmocítica severa con marcado infiltrado coriónico y autólisis de las células trofoblásticas (Figura 2). Otros hallazgos fueron la presencia de meningitis linfocítica leve y focos hemorrágicos en la corteza adrenal. Todos los tejidos mencionados evidenciaban signos de autólisis.

Mediante la técnica de Inmunohistoquímica (IHQ) se observó, en el pulmón fetal, marcación para antígenos de *Brucella* dispuestos principalmente en el interior de células macrofágicas alveolares, aunque también se observó presencia de antígeno brucelar extracelular en los septos inter-alveolares y en la pleura (Figura 3).

En las pruebas serológicas 79/124 animales resultaron positivos a BPA (63%). De estos, 40 fueron positivos a SAT > 1/100 o 2-ME+ (32,2%). Todas las cerdas serorreactoras eran de 3ª a 5ª parición. Cuatro de los 6 padrillos del criadero resultaron serológicamente positivos presentando uno de ellos orquitis clínicamente detectable. El suero de la cerda abortada, resultó positivo a la prueba de BPA, con título de 1/200 para SAT y 2-ME.

Discusión y conclusiones

El aislamiento de *B. suis* biovar 1A a partir de las muestras fetales y pla-

centa junto a los resultados serológicos permiten confirmar el diagnóstico de brucelosis en la piara. En la bibliografía se mencionan hallazgos macroscópicos en los fetos abortados por *B. suis* como edema subcutáneo, especialmente en la región umbilical y abundante contenido líquido en las cavidades²⁹. En el presente caso, no se observaron dichas alteraciones posiblemente como consecuencia de la severa autólisis. Histológicamente, los abortos por *Brucella spp* se caracterizan por presentar poliserositis y bronconeumonía²⁹, aunque en bovinos se menciona a la neumonía intersticial en abortos tempranos, en coincidencia con los hallazgos del presente trabajo^{8,11}. Las células trofoblásticas placentarias suelen ser el primer blanco de *Brucella spp* por lo que generalmente se las encuentra tumefactas y con abundantes cocobacilos en su citoplasma^{8,29}. En el presente trabajo, la lesión placentaria observada fue de tipo linfoplasmocítica y si bien se describe la presencia de exudado mixto infiltrando en el corion, necrosis, edema, deposición de fibrina y en algunos casos vasculitis⁸, es factible que las mismas fueran enmascaradas por la severa autólisis presente.

La técnica de inmunohistoquímica reveló la presencia del microorganismo a nivel pulmonar, tanto extracelular como intracelular siendo características de las infecciones por *Brucella*¹⁹. *Brucella spp.* son microorganismos patógenos intracelulares facultativos que se introducen en células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos y células del trofoblasto) e inhiben los mecanismos de lisis de dichas células favoreciendo su supervivencia y replicación^{8,26}. Los hallazgos de la IHQ son similares a los publicados para bovinos, cabras, ovejas y ratones infectados con otras especies de *Brucella*^{19,23,32}. El diagnóstico serológico de la piara indica una alta difusión del agente en la población dentro del establecimiento confirmando su fácil diseminación^{7,30} y la alta tasa de contagio.

El aborto por *B. suis* puede producirse en cualquier momento de la gestación²¹ aunque se menciona que no deben esperarse altas tasas de abortos como sería el caso de *B. abortus* siendo en cambio típico el nacimiento lechones débiles y mortinatos²⁹. Tanto el biovar 1 como el 3 de *B. suis* son patógenos para los humanos²¹, siendo el primero el que ocasiona mayor daño clínico en los pacientes¹³. La biovar 2 difiere en su

comportamiento epidemiológico dado que posee otro rango de hospedadores y su distribución geográfica es limitada¹⁶. En Argentina, de 367 aislamientos positivos de *Brucella spp* provenientes de casos humanos realizados entre los años 1994 y 2006; 144 (39,2%) correspondieron a *B. suis*, siendo el biovar 1 el más frecuentemente aislado¹⁷.

Si bien la brucelosis porcina ha sido estudiada desde los años 40 en nuestro país, los registros de casos clínicos naturales son escasos y se desconoce cuál es la situación epidemiológica actual de la enfermedad. Entre 1960 y 1980, diversos estudios han mencionado que la prevalencia osciló entre el 14,2 y el 25%²⁷. Castro *et al*⁹ analizaron 325 sueros de animales faenados de las provincias de La Pampa y Buenos Aires, registrando 17,8% positivos a BPA, el 13,8% positivos a SAT y el 8% positivo a 2-ME. En la provincia de La Pampa, sobre un total de 2716 sueros analizados de 156 establecimientos porcinos, se determinó una prevalencia del 5,7% y 15,4% positivos, respectivamente¹⁴. La mayor cantidad de serorreectores se registró en establecimientos de áreas suburbanas en las cuales los productores poseían animales para consumo propio o para abastecimiento local²⁷. En contraste, en el presente caso, el brote fue detectado en un establecimiento comercial lo que representa una evidencia real del problema, aun en sistemas intensivos. La vacunación es una alternativa que ha sido probada para controlar de la enfermedad en otros países¹² pero en Argentina no están disponibles vacunas para tal fin. La erradicación de la brucelosis porcina requiere la identificación de los animales enfermos y su eliminación^{3,10} además es esencial el control de los verracos debido al papel crucial que estos cumplen en la difusión de la enfermedad tanto en sistemas con servicio natural o inseminación artificial^{2,12}. Debe contemplarse que nuestro país no cuenta con un programa oficial de control y, puesto que todos los estudios efectuados hasta la fecha son regionales, se desconoce la prevalencia de la brucelosis porcina a nivel nacional. Son esenciales futuros estudios para determinar cuál es la situación sanitaria real respecto a esta enfermedad de las piaras comerciales en Argentina.

Agradecimiento

A la Dra. Nidia Lucero del "Instituto Carlos G. Malbrán", que efectuó la tipificación de la cepa aislada.

Bibliografía

1. **Acha P, Szyfres B.** Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales: bacteriosis y micosis. 3a ed. Washington, EEUU: OPS. 2001. pp 28-52.
2. **Althouse GC, Lu KG.** Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriogenology* 2005; 63: 573–584.
3. **Alton GG.** *Brucella suis*. En: Animal Brucellosis, Nielsen K. & Duncan J.R., editors. CRC Press, Boston, EE.UU. 1990.
4. **Alton G, Jones L, Pietz D.** Serological methods. *En: Laboratory techniques in brucellosis.* Chapter 2. FAO and WHO, Geneva. 1975; pp. 64-124.
5. **Angus RD, Burton C.** The production and evaluation of a buffered plate antigen for use in presumptive test for brucellosis. *Dev Biol Stan* 1984; 56: 349-56.
6. **Baldi PC, Cassataro J, Comerci DJ, Estein S, Fossati CA, Giambartolomei GH, et al.** *Brucella* En: Microbiología Veterinaria. Stanchi NO, Martino PE, Gentilini E, Editors. Microbiología Veterinaria. 2007. p281-293.
7. **Beer J.** Infektionskrankheiten der Haustiere. J. Beer (Ed.). 2nd ed. Jena: VEB Fischer-Verlag, 1980. p 528.
8. **Carvalho Neta AV, Mol JS, Xavier MN, Paixão TA, Lage AP, Santos RL.** Pathogenesis of bovine brucellosis. *Vet J* 2010;184: 146–155.
9. **Castro HA, González SR, Prat MI, Baldi PC.** Detección de anticuerpos anti-*Brucella spp.* en cerdos mediante técnicas de aglutinación y ELISA indirecto en las provincias de Buenos Aires y La Pampa, Argentina. *Rev Arg Microbiol* 2006; 38: 75-78.
10. **Crespo Leon F, Gutierrez Diez F, Rodriguez Ferri EF, Leon Vizcaino L, Cuello Gijon F, Gimeno EJ, et al.** Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees): problems, solutions and conclusions. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE.* 2005; 24 (3):1095-1104.
11. **Ewalt DR, Payeur JB, Rhyhan JC, Geer PL.** *Brucella suis* biovar 1 in naturally infected cattle: a bacteriological, serological, and histological study. *J Vet Diagn Invest* 1997; 9:417–420.
12. **European food Safety Authority.** Porcine Brucellosis (*Brucella suis*). *EFSA J* 2009; 1144: 1-111
13. **Fretin D, Whatmore AM, Aldahouk S, Neubauer H, Garin-Bastuji B, Albert D, et al.** *Brucella suis* identification and biovar typing by real-time PCR. *Vet Microbiol* 2008; 131: 376–385.
14. **Fort M, Baldone V, Fuchs L, Miranda A, Giménez H, Rojas M, et al.** Relevamiento serológico de la brucelosis porcina en la provincia de La Pampa durante el periodo 2005-2006. En: Suarez, V. editor. Investigación en Producción Animal. EEA- INTA-Anguil. 2006; 4: 85-87.
15. **García Carrillo C.** Animal and Human Brucellosis in the Americas. Paris: Office International des Epizooties. 1990; 296:16.
16. **Godfroid J, Michel P, Uytterhaegen L, De Smedt C, Rasseneur F, Boelaert F, et al.** Brucellose enzootique a *Brucella suis* biotype 2 chez le sanglier (*Sus scrofa*) en Belgique. *Ann Med Vet* 1994; 138: 263–268.
17. **Lucero NE, Ayala SM, Escobar GI, Jacob NR.** *Brucella* isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. *Epidemiol Infect* 2007; 1-8.
18. **Maes D, Nauwynck H, Rijsselaere T, Mateusen B, Vyt P, De Kruif A, et al.** Diseases in swine transmitted by artificial insemination: An overview. *Theriogenology.* 2008; 70:1337–1345.
19. **Meador VP, Tabatabai LB, Hagemoser WA, Deyoe BL.** Identification of *Brucella abortus* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of cows, goats, and mice with an avidin-biotin-peroxidase complex immunoenzymatic staining technique. *Am J Vet Res* 1986; 47: 2147-2150.
20. **Morrell E, Poso MA, Campero CM.** Empleo de la técnica de avidina biotina peroxidasa en el diagnóstico del aborto bovino. 12th International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians. November, 2005; Poster. Montevideo, Uruguay.
21. **OIE.** Cap.2.8.5. Brucellosis porcina. En: Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres. 5ta Ed. 2004; http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.08.05.%20Brucellosis%20porcina.pdf
22. **Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV.** The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis* 2006; 6: 91–99.
23. **Pérez J, Quezada M, López J, Casquet O, Sierra MA, Martín de las Mulas J.** Immunohistochemical detection of *Brucella abortus* antigens in tissues from aborted bovine fetuses using a commercially available polyclonal antibody. *J Vet Diagn Invest* 1998, 10: 17-21.
24. **Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC.** Especies de *Brucella*. En: Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias. Ed. Acribia. Zaragoza. 2005; 197-203.
25. **Paulo PS, Vigliocco AM, Ramondino RF, Marticorena D, Bissi E, Briones G, et al.** Evaluation of primary binding assays for presumptive serodiagnosis of swine brucellosis in Argentina. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 7: 828–831.
26. **Roop MR, Bellaire BH, Valderas MW, Cardelli JA.** Adaptation of the *brucellae* to their intracellular niche. *Mol Microbiol J* 2004; 52: 621–630.
27. **Samartino LE.** *Brucellosis* in Argentina. *Vet Microbiol* 2002; 90: 71–80.
28. **SCWDS Briefs.** Pseudorabies and Brucellosis Problems in Feral Swine. April 2004. Vol. 20 No. 1.
29. **Schlafer D, Miller RB.** Female genital system. In: Grant Maxie M editor. Pathology of domestic animals. Vol III, fifth Edition. Editorial Saunders-Elsevier. 2007. pp: 474-537.
30. **Szulowski K.** Diagnosis of *Brucella suis* infections in pigs and hares by ELISA. *Polish J Vet Sci,* 1999. 2: 65-70.
31. **Terzolo HR, Paolicchi FA, Moreira AR, Homse A.** Skirrow agar for simultaneous isolation of *Brucella* and *Campylobacter* species. *Vet Rec* 1991; 129: 531-532.
32. **Yazicioglu O, Hazioglu R.** Pathological and immunoperoxidase studies of the placental lesions of ovine brucellosis. *Israel J Vet Med* 2000; http://www.isrvma.org/article/55_3_5.htm