

BRUCELOSIS PORCINA EN ESPAÑA: ESTUDIO SEROLOGICO Y BACTERIOLOGICO DE 11 BROTES .

P. M^a Muñoz, M^a J. De Miguel, J. M^a Blasco, C. M^a Marín

Servicio de Investigación Agroalimentaria Apartado 727. 50.080 Zaragoza

INTRODUCCIÓN

La infección por *Brucella suis* se ha considerado un proceso prácticamente inexistente en España y esto parece ser cierto en los sistemas intensivos de producción porcina. Sin embargo, la prevalencia de la brucelosis porcina en sistemas extensivos, y en particular en el cerdo ibérico, esta aumentando preocupantemente en los últimos años. Al no existir vacunas adecuadas ni ningún procedimiento totalmente efectivo para su diagnóstico y control, la brucelosis porcina puede poner en serio peligro uno de los sistemas de explotación porcina más interesantes de nuestro país. En caso de sospecha de enfermedad, los animales son analizados serológicamente mediante las pruebas oficiales de Rosa de Bengala (RB) y fijación del complemento (FC), que son muy poco específicas en ganado porcino (Lord et al. 1997). Si bien no existen demasiados estudios, la mayoría de las infecciones porcinas en nuestro país parecen ser producidas por las biovariedades 1 y 2 de *B. suis* (Leon Vizcaino et al. 1976). La prueba laboratorial mas utilizada para diferenciar las biovariedades 1 y 2 de *B. suis* es la producción de gas sulfhídrico (SH₂), lo que resulta demasiado subjetivo y conduce a frecuentes errores. El objetivo de este trabajo es hacer una recopilación de los aspectos diagnósticos mas relevantes de 11 brotes de brucelosis porcina diagnosticados por nuestro laboratorio en los últimos años en distintas provincias españolas y aportar información relativa a la diferenciación de las biovariedades 1 y 2 de *B. suis*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los 11 brotes de brucelosis porcina se detectaron en otras tantas explotaciones que presentaban problemas reproductivos (abortos, orquitis, repeticiones de celos, infertilidad y mortalidad perinatal elevada). Nueve de ellas eran explotaciones extensivas o semiextensivas de cerdo ibérico (situadas en Extremadura, Salamanca, Huelva y Córdoba), mientras que las otras dos eran explotaciones intensivas, una de cerdo "blanco" (Toledo) y otra de cerdos de la raza Duroc (Soria), en las que se habían introducido cerdos ibéricos para cruzamiento. La clínica fue muy similar en todas las explotaciones.

Para el diagnóstico, en todos los casos se tomaron muestras de sangre (para estudios serológicos) e hisopos vaginales y leche (para estudios bacteriológicos) de los animales sospechosos de padecer la enfermedad por presentar aborto o problemas reproductivos. Los sueros se analizaron mediante las pruebas de diagnostico oficial de brucelosis: RB, usando la técnica modificada -RBm- (Blasco et al. 1994) y FC -cuando el grado de hemólisis del suero lo permitía-, así como un ELISA indirecto (ELISA-i) (Marín et al 1999). Como controles de la especificidad de estas pruebas se usaron 40 sueros de animales de explotaciones intensivas libres de enfermedad.

El diagnóstico bacteriológico se llevo a cabo mediante siembra de los hisopos vaginales y leche en los medios selectivos de Farrell (Farrell 1974) y Thayer-Martin modificado (Marín et al. 1996) y posterior identificación de los aislamientos según técnicas microbiológicas convencionales (Alton et al 1988). Las cepas aisladas fueron estudiadas paralelamente mediante amplificación por PCR de los genes de las proteínas de membrana externa omp2a, omp2b (Cloeckaert et al 1995) y Omp31 (Vizcaino et al 1997) y posterior restricción enzimática (PCR-RFLP) de los productos

amplificados. Estas técnicas, han sido aceptadas para la diferenciación de las biovariedades 1 y 2 de *B. suis*. En estos últimos estudios también se incluyeron 10 cepas aisladas por el Centro Nacional de Brucelosis de Lisboa en las regiones portuguesas limítrofes con España.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las distintas pruebas serológicas empleadas el RBm y el ELISA-i resultaron más sensibles que la prueba RB convencional, y útiles para el diagnóstico presuntivo de la infección ya que todos los animales de los que se aisló *B. suis* fueron positivos tanto en RBm como ELISA-i (Tabla 1). Sin embargo, esta última prueba presentó problemas de especificidad resultando siempre positivos entre el 10 y el 20 % de los animales controles negativos procedentes de explotaciones libres de brucelosis. La prueba de FC presentó unos niveles de sensibilidad muy bajos (alrededor del 70%), en aquellos casos en los que se pudo usar ya que una elevada proporción de muestras presentaba hemólisis severa. Resultados similares han sido obtenidos por otros autores (Lord et al. 1997), poniendo en evidencia el escaso valor diagnóstico de la prueba de FC para la brucelosis porcina. Una vez confirmada bacteriológicamente la enfermedad, se procedió al estudio serológico individual de la totalidad de explotaciones, detectándose siempre que mas del 50 % de los animales de cada explotación eran positivos al RBm. Es muy posible que esta sea la prevalencia real de la enfermedad en las explotaciones afectadas, pero debido a que esta prueba puede resultar también positiva en caso de infecciones por *Yersinia enterocolitica* O:9 (Walravens et al. 2002) no se puede confirmar. Tampoco el ELISA-i, puede resolver este grave problema de las reacciones cruzadas, al menos usando antígenos de superficie.

Las 50 cepas aisladas de las distintas explotaciones, cuando se tipificaron con las técnicas convencionales de producción de SH₂ resultaron ser en todos los casos *Brucella suis* biovariedad 2. En España la brucelosis porcina se encuentra descrita desde 1940, habiéndose descrito infecciones en los cerdos por *B. suis* biovariedades 1, 2, y 3 y por *B. melitensis* biovariedad 1 (Leon Vizcaino et al 1976). La biovariedad 1 se ha descrito como positiva en la prueba de SH₂ (mas intensa que *B. abortus*), mientras que la biovariedad 2 es considerada SH₂ negativo (como *B. melitensis*). En las 50 cepas aisladas en España y en las 10 remitidas de Portugal, la prueba de producción de SH₂ variaba en su resultado según el medio de cultivo empleado. Cuando se utilizó el medio Tripticasa Soja Agar (TSA) no existía producción de SH₂ por ninguna cepa. Sin embargo, todas las cepas resultaban positivas usando el medio Blood agar Base Nº 2 (BAB). Por ello, se comparó la producción de SH₂ en las 60 cepas y de todas las cepas de referencia de *Brucella* (incluyendo las cepas control de *B. suis* biovariedad 1 (cepa 1330) y biovariedad 2 (Thomsen)) en medios TSA y BAB conteniendo 0, 0,1 y 0,5 % de extracto de levadura. Independientemente del medio usado, todas las cepas eran SH₂ positivo cuando se sembraban en medios con un 0,5 % de extracto de levadura y esta producción era incluso mas intensa cuando se incluía suero en el medio de cultivo. Este hecho demuestra que la metodología clásica para diferenciación de las biovariedades 1 y 2 de *B. suis* no es adecuada y resulta evidente que las cepas de la biovariedad 2 también podrían producir SH₂ en determinadas condiciones, tal y como se ha descrito recientemente para *B. melitensis* (DelVecchio et al. 2002).

Sin embargo, los resultados de los estudios de PCR-RFLP de todas las cepas demostraron que 4 de ellas mostraban patrones moleculares característicos de *B. suis* biovariedad 1, dando el resto el patrón de la biovariedad 2 (Figura 1). Resultados

discordantes similares han sido encontrados por J. M. Verger (comunicación personal) en algunas cepas de *B. suis* aisladas de cerdos de origen español, en las que se obtuvieron patrones característicos de *B. suis* biovariedad 2 con el gen Omp 2a y de *B. suis* biovariedad 1 con el gen Omp 2b, cuestionando seriamente la utilidad discriminatoria aceptada para esta prueba. La técnica PCR-RFLP para el gen Omp 31 ha sido descrita también como discriminatoria entre ambas biovariedades (Vizcaino et al 1997). Sin embargo, también realizamos esta técnica y la cepa de referencia de la biovariedad 2 y las 60 cepas testadas no se diferenciaron tampoco de la cepa de referencia de la biovariedad 1. Estos resultados cuestionan la validez de las técnicas actuales de tipificación de las diferentes biovariedades de *B. suis*.

Tabla 1 Resultados de las pruebas serológicas para el diagnostico de la brucelosis porcina sobre 50 sueros de animales con cultivo positivo y 40 de animales de granjas libres de enfermedad

Positivos en	Animales Cultivo +	Animales libres
Rosa de Bengala	50	0
Fij. de Complemento*	21	0
ELISA-i	50	2

* solamente se testaron 30 sueros (los demás estaban hemolizados)

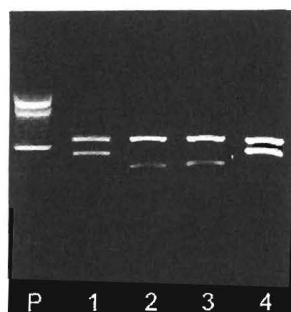


Figura 1: Perfiles PCR-RFLP del gen de la proteína Omp2b de *Brucella* digerido con *EcoRI* (C: control negativo; P marcador molecular de 100 pb, 1: perfil obtenido con la cepa de referencia de *B. suis* biovar.1; 2: perfil obtenido con la cepa de referencia de *B. suis* biovar.2, 3: perfil obtenido con 46 cepas españolas y 10 portuguesas; 4: perfil obtenido con 4 cepas españolas –cuya tipificación convencional coincidía con la biovariedad 2–)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alton et al 1988 *En: Techniques for the brucellosis laboratory INRA*; Blasco et al. 1994; *The Veterinary Record* **134**, 415; Cloeckert et al 1995 *Microbiology* 1995, **141**(Part 9), 2111.; DelVecchio et al. 2002 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**(1), 443; Farell 1974 *J. Appl. Bact.*, **35**, 625; Lord et al. 1997 *Journal of Clinical Microbiology*, **35**(1), 295, Leon Vizcaino et al. 1976 *Suplemento Científico del Boletín Informativo Consejo General de Colegios Veterinarios de España* **206**, 37; Marín et al. 1996 *Journal of Clinical Microbiology*, **34**(2), 426; Marín et al 1999 *Clinical & Diagnostic Laboratory Immunology*, **6**(2), 269; Vizcaino et al 1997 *Microbiology*, **143**(Part 9), 2913; Walravens et al. 2002 *Proceedings of 53rd brucellosis research conference*, p51).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la CICYT (Proyecto AGL2000-0305-C02-02 y Proyecto AGL2000-0299-C03)