

Aislamiento y caracterización de *Brucella abortus* biovar 1 en fetos abortados de rodeos bovinos de la Provincia de Buenos Aires, Argentina

Isolation and characterization of *Brucella abortus* biovar1 in aborted fetuses from cattle herds in the Province of Buenos Aires, Argentina

Isolamento e caracterização de *Brucella abortus* biovar 1 em fetos abortados de rebanhos bovinos na Província de Buenos Aires, Argentina

Koval A¹<https://orcid.org/0009-0003-4392-3948>, Iriarte M² <https://orcid.org/0009-0003-7926-5342>, Fanti S² <https://orcid.org/0009-0008-4077-9721>, Cillero M², <https://orcid.org/0009-0006-4810-5372>, Collova V² <https://orcid.org/0009-0005-8095-7563>, Franco C³ <https://orcid.org/0009-0003-0917-3303>, Coppola L³ <https://orcid.org/0009-0008-2626-3948>, Fabeiro M³ <https://orcid.org/0009-0002-8335-9707>, Elena S³ <https://orcid.org/0000-0002-2694-8276>

¹ Biogénesis Bagó, Ruta Panamericana Km 38.5, Garín, Buenos Aires.

² Laboratorio Azul Diagnóstico, 25 de mayo 479, Azul, Buenos Aires.

³ Dirección General de Laboratorios y Control Técnico, Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). Talcahuano 1669, Martínez (CP1640), Buenos Aires.

Correo electrónico: selena@senasa.gob.ar

DOI: <https://doi.org/10.19137/cienvet.v28.9805>

Fecha de recibido: 10 de marzo de 2026 **Fecha de aceptado para su publicación:** 16 de junio de 2026

Resumen

Durante el año 2025, el Laboratorio Azul recibió un total de 68 fetos bovinos abortados procedentes de diferentes rodeos de la Provincia de Buenos Aires para diagnóstico etiológico. En 7 de ellos, originarios de los partidos de Alvear, Lamadrid, Benito Juárez, Ayacucho y Tapalqué, se detectó y aisló *Brucella spp.* a partir de muestras de líquido abomasal y pulmón. La detección inicial se realizó mediante inmunofluorescencia directa y coloración de Stamp, seguida de cultivo en medios selectivos. Los aislamientos fueron remitidos al Departamento de Brucelosis del SENASA, donde se confirmó mediante pruebas bioquímicas y PCR multiplex que correspondían a *Brucella abortus* biovar 1 de campo, descartándose la participación de las cepas vacunales S19 y



RB51. Estos hallazgos evidencian la circulación activa de *B. abortus* en rodeos de cría de la región pampeana, a pesar de la implementación del Plan Nacional de Control y Erradicación

Palabras clave: *Brucella abortus*, brucelosis, biovar

Abstract

During 2025, the Azul Laboratory received a total of 68 aborted bovine foetuses from different herds in the Province of Buenos Aires for etiological diagnosis. In 7 of them, originated from the districts of Alvear, Lamadrid, Benito Juárez, Ayacucho, and Tapalqué, *Brucella* spp. was detected and isolated from abomasal fluid and lung samples. Initial detection was performed using direct immunofluorescence and Stamp staining, followed by culture on selective media. The isolates were sent to the Brucellosis Department of SENASA, where they were confirmed by biochemical tests and multiplex PCR as belonging to *Brucella abortus* biovar 1 field strains, ruling out the involvement of the vaccine strains S19 and RB51. These findings demonstrate the active circulation of *B. abortus* in breeding herds in the Pampas region, despite the implementation of the National Control and Eradication Plan

Keywords: *Brucella aborus*, brucellosis, biovar1

Resumo

Durante o ano de 2025, o Laboratório Azul recebeu um total de 68 fetos bovinos abortados de diferentes rebanhos da Província de Buenos Aires para diagnóstico etiológico. Em 7 desses fetos, originários dos distritos de Alvear, Lamadrid, Benito Juárez, Ayacucho e Tapalqué, *Brucella* spp. foi detectada e isolada em amostras de fluido abomasal e pulmão. A detecção inicial foi realizada por meio de imunofluorescência direta e coloração de Stamp, seguida de cultura em meios seletivos. Os isolados foram enviados ao Departamento de Brucelose do SENASA, onde testes bioquímicos e PCR multiplex confirmaram que correspondiam à *Brucella abortus* biovar 1 isolada em campo, descartando o envolvimento das cepas vacinais S19 e RB51. Esses achados demonstram a circulação ativa de *B. abortus* em rebanhos reprodutores na região dos Pampas, apesar da implementação do Plano Nacional de Controle e Erradicação

Palavras-chave: *Brucella abortus*, brucelose, biovar

Introducción

La brucelosis bovina es una enfermedad zoonótica producida por *Brucella abortus*, que tiene consecuencias tanto a nivel productivo como en la salud pública.^(1,2) En los bovinos provoca abortos en el último tercio de la gestación, generalmente por única vez, infertilidad, disminución del potencial productivo de los animales crónicamente infectados que, si no son eliminados del rodeo, mantienen la bacteria la cual va a ser eliminada masivamente con cada parto, contaminando el ambiente, infectando a nuevos animales en cada temporada y perpetuando la infección.^(3,4)

En los humanos produce una infección crónica que, de no ser detectada y tratada a tiempo, puede resultar invalidante. Episodios de fiebre ondulante, con alta temperatura y fuertes dolores musculares, sudoración, dolor de cabeza, inflamación de las articulaciones y ganglios linfáticos, cansancio, pérdida de peso y falta de apetito suelen ser los signos más comunes en personas infectadas.⁽⁵⁾

Es considerada una enfermedad profesional, que afecta a trabajadores rurales y de la industria frigorífica ⁽⁶⁾ y a médicos veterinarios, expuestos a material infeccioso durante maniobras obstétricas, atención de partos o tactos.^(7,8,9)

La vacunación obligatoria y masiva de las terneras entre los 3 y 8 meses de edad en Argentina⁽¹⁰⁾ con vacuna elaborada con cepa 19, ha sido y es la herramienta más segura y probada para aumentar la resistencia a la infección, disminuir las tasas de abortos y bajar la prevalencia de la enfermedad. Sin embargo, debe ser complementada con el análisis serológico y eliminación de los animales positivos.⁽¹¹⁾ La combinación de estas herramientas ha permitido la erradicación de la enfermedad en muchos establecimientos, regiones y países.

El objetivo de este trabajo fue describir la metodología y analizar los aislamientos de *Brucella* spp obtenidos en Laboratorio Azul durante el año 2025

Materiales y Métodos

Procedencia

Los fetos analizados, incluidos en el presente estudio, fueron remitidos refrigerados al Laboratorio Azul por Médicos Veterinarios de la actividad privada. Todos procedentes de rodeos

de cría ubicados en los partidos de Alvear, Lamadrid, Benito Juárez, Ayacucho y Tapalqué de la Provincia de Buenos Aires, para la investigación de agentes causales de abortos.

Necropsia y toma de muestras

En todos los casos se realizó análisis anatomopatológicos macroscópico y microscópico. Se recolectaron muestras de contenido de abomaso, exudado de cavidades, contenido intracardiaco, pulmón, hígado, riñón, bazo, corazón, linfonódulo mesentérico y sistema nervioso central para la investigación de los diferentes patógenos.

Inmunofluorescencia directa (IFD) para *Brucella* spp

Se realizaron improntas delgadas de líquido de abomaso y pulmón, las mismas fueron secadas a temperatura de laboratorio y fijadas en acetona a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos. A cada impronta se le añadieron $20\text{ }\mu\text{L}$ de conjugado anti-*Brucella* marcado con isotiocianato de fluoresceína, desarrollado por el Laboratorio Azul y utilizado en una dilución 1:30. Posteriormente, las muestras se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en cámara húmeda durante 45 minutos. Finalizada la incubación, se efectuó un lavado durante 5 minutos en agua destilada. Secados los preparados, se agregó una gota de glicerina bufferada y se cubrió con un cubreobjetos. Se realizó la observación en microscopio de inmunofluorescencia con objetivo de inmersión de $100\times$ (Carl Zeiss).

Coloración de Stamp

Las muestras que resultaron positivas a la inmunofluorescencia (contenido de abomaso y pulmón) fueron verificadas mediante la coloración de Stamp⁽¹²⁾ para asegurar la especificidad de la IFD.

Cultivo y aislamiento

Las muestras de líquido de abomaso y pulmón se sembraron en agar *Brucella* (BD Difco) y agar sangre y se incubaron en una jarra con vela (aproximadamente con 5% de CO_2). También se sembraron en placas de agar Skirrow (Biokar Diagnostics)⁽¹³⁾ con suplemento selectivo (Oxoid), así como en agar sangre; estas últimas se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3 días en una jarra con un sobre generador de atmósfera microaerófila (CampyGen, Thermo Scientific). Finalmente, los aislamientos obtenidos fueron remitidos en condiciones de bioseguridad al Departamento de Brucelosis de SENASA para la realización de pruebas bacteriológicas y moleculares.

Identificación y pruebas bacteriológicas

Las colonias aisladas fueron examinadas mediante transiluminación oblicua, prueba de acriflavina y actividad ureásica. Para establecer el biovar se realizaron las pruebas bioquímicas

de producción de ácido sulfhídrico, desarrollo en presencia de colorantes (tionina, fucsina y safranina; Sigma-Aldrich) y aglutinación con sueros policlonales mono-específicos (sueros anti-antígenos A y M) elaborados en SENASA. Durante las pruebas de identificación, se utilizaron cepas referencia de *B. abortus* biovar 1, *B. suis* biovar 1 (1330) y *B. melitensis* biovar 1, procedentes de la colección de cultivos del SENASA. Las técnicas bacteriológicas, se realizaron siguiendo los procedimientos estándar ⁽¹²⁾ (Alton et al, 1988).

Extracción de ADN y PCR Multiplex (Bruce-ladder)

Se resuspendieron las colonias aisladas en 500 µL de agua grado biología molecular. La extracción del material genómico se realizó mediante shock térmico en un termobloque (Thermocell Cooling & Heating – HB 202. BIOER. China) a 95 °C, durante 10 min con posterior enfriamiento a 4 °C. A continuación, se realizó una centrifugación de 10 min a 8000 rpm para producir el precipitado de los restos celulares y la obtención del sobrenadante como templado (ADN) para la realización de la técnica PCR Multiplex. Este procedimiento también se realizó para las cepas de vacunas *B. abortus* S19 y RB51 y *B. suis* 1330 utilizadas como control. El ADN extraído se conservó a -20 °C. La amplificación de ácidos nucleicos se realizó siguiendo el procedimiento descrito por López-Goñi et al. 2008⁽¹⁴⁾ con modificaciones. Para llevar a cabo las diferentes reacciones de amplificación se utilizó un termociclador (Thermal Cycler 2720 – Applied Biosystems. Singapore), los productos de amplificación fueron sembrados en geles de agarosa al 2 %, teñidos con Bromuro de Etidio (BioBasicINC., solución 10 mg/ml) y sometidos a corridas electroforéticas durante 30 min a 80 V. Se utilizaron cubas electroforéticas (Wide Mini-Sub Cell GT – BIORAD. Argentina). Los geles fueron visualizados utilizando un transiluminador de luz UV (Macro Vue UV-20 – Hoefer Pharmacia Biotech. San Francisco CA, USA).

Resultados

Hallazgos anatomopatológicos macroscópicos

En 2/7 fetos se observó fibrina en cavidad abdominal, torácica y consolidación pulmonar. En los 5 fetos restantes no se observaron lesiones macroscópicas relevantes.

Hallazgos anatomopatológicos microscópicos

En sistema nervioso central se observó gliosis nodular multifocal moderada. A nivel pulmonar bronconeumonía histiocítica difusa severa con pleuritis no supurativa y trombosis. En corazón epicarditis histiocítica difusa leve a moderada. En hígado hepatitis histiocítica portal aleatoria multifocal moderada.

Inmunofluorescencia directa

Se observaron cocobacilos con fluorescencia de intensidad variable en las muestras analizadas de los 7 (siete) fetos (Foto 1).

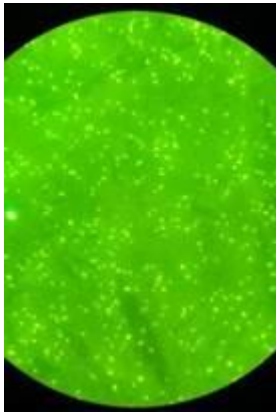


Foto1: Inmunofluorescencia directa en líquido de abomaso. Se aprecian abundantes estructuras cocobacilares con fluorescencia verde (Aumento 100x).

Cultivo y aislamiento

En los 7 fetos remitidos se aislaron cepas de *Brucella* spp. en las 2 condiciones de incubación descriptas. (Foto 2)



Foto 2: Aislamiento de *Brucella* spp. en medio selectivo Skirrow a partir de líquido abomasal. Se aprecia la eficacia del medio para permitir el crecimiento de colonias color ámbar pálido, manteniendo la transparencia y el brillo característico.

Tipificación bacteriológica

La tipificación mediante métodos bacteriológicos clásicos, específicamente el perfil de crecimiento en colorantes, permitió identificar las cepas aisladas como *Brucella abortus* Biovar1 (Foto 3)

Biovar1 (Foto 3)

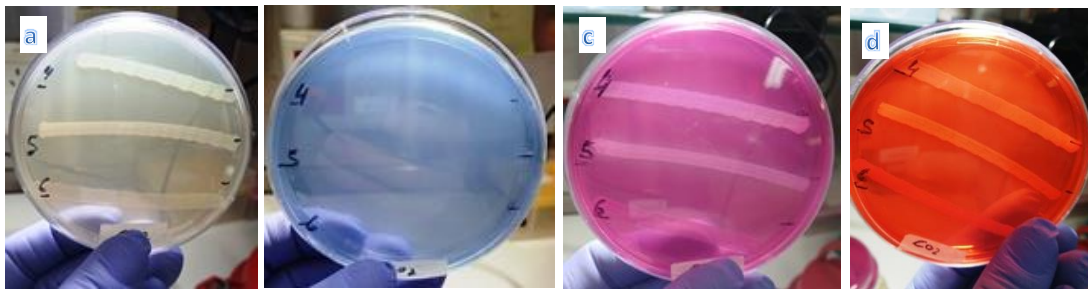


Foto 3. Pruebas de crecimiento en presencia de colorantes: **(a)** control en agar triptosa, **(b)** tionina, **(c)** fucsina básica y **(d)** safranina. Referencias: **4** cepa control *B. abortus* bv. 1; **5** y **6**: aislamientos analizados. Nótese la inhibición del desarrollo en el medio con tionina (b) y el crecimiento satisfactorio en fucsina (c) y safranina (d), perfil compatible con *B. abortus* bv. 1.

Identificación molecular

La técnica de PCR Multiplex permitió la tipificación en un solo paso de las cepas de *B. abortus*, amplificando los fragmentos de 1682 pb., 794 pb., 587 pb., 450 pb. y 152 pb. correspondiendo este perfil a *B. abortus* de campo, diferenciándose de las cepas vacunales S19, que no produce el fragmento de 587 pb y RB51, la cual se diferencia por la ausencia de los fragmentos de 1682 y 1320 pb. como así también por un fragmento adicional de 2524 pb. (Foto 4).

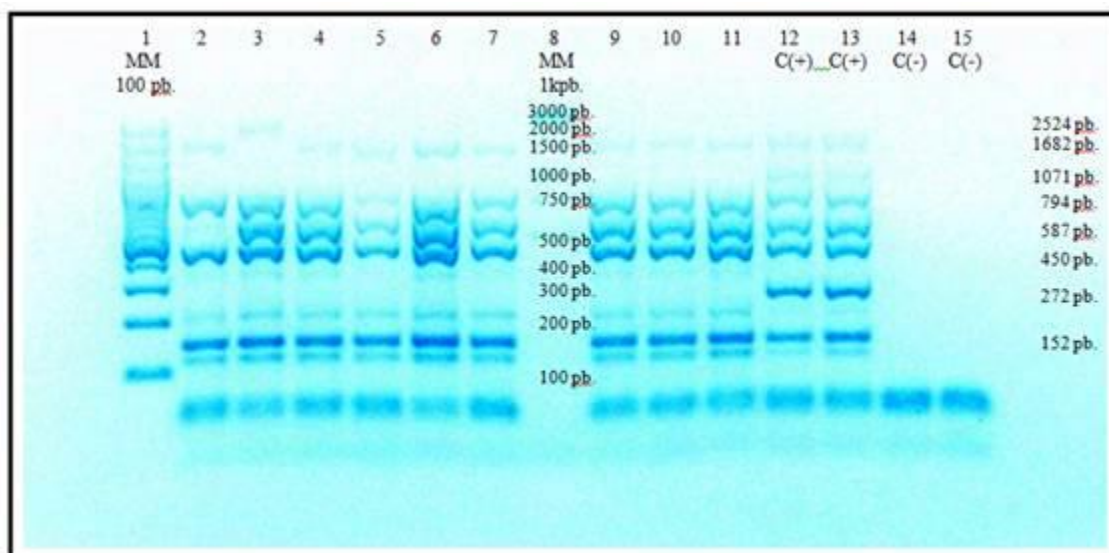


Foto. 4. Tipificación Bruce-ladder: Calle 1: Marcador de peso molecular de 100 pb., Calle 2: Cepa correspondiente a *B. abortus* cepa vacunal S19. Calle 3: *B. abortus* cepa vacunal RB51. Calles 4 a 7: Cepas de *B. abortus* aisladas en fetos bovinos. Calle 8: Marcador de peso molecular de 1kpb. Calles 9 a 11: Cepas de *B. abortus* aisladas en fetos bovinos. Calles 12 y 13: Cepas utilizadas como controles positivos de *B. suis*. Calle 14: Control negativo de extracción. Calle 15: Control negativo de pcr.

Discusión

La IFD resultó una técnica rápida, sencilla, con muy buena correlación con la coloración de Stamp y el cultivo. Todas las cepas desarrollaron en los tres medios de cultivo (agar sangre, agar brucella y Skirrow) y en las dos condiciones de incubación, mostrando un mejor desarrollo en los medios selectivos (agar brucella y Skirrow) y una mayor velocidad de crecimiento en la jarra con sobre de atmósfera microarófila (incubación a 37 grados durante 72 horas). El cultivo en agar Skirrow en condiciones de microaerofilia resultó muy efectivo para el aislamiento de *Brucella*.

La tipificación bacteriológica permitió identificar los aislamientos como pertenecientes al biovar 1 de *Brucella abortus*, históricamente el más frecuente en Argentina, aunque también se ha reportado el biovar 2.⁽¹⁵⁾

La PCR Multiplex resultó una herramienta muy útil para descartar la participación de cepas vacunales (RB 51 y S19) en los abortos.

Conclusiones

Sobre los 68 fetos bovinos remitidos al laboratorio para diagnóstico etiológico, el 10.3 % resultaron positivos a *Brucella abortus*, lo cual refleja el alto nivel de circulación de esta bacteria en los rodeos bovinos.

Los métodos bacteriológicos y bioquímicos tradicionales complementados con técnicas moleculares permitieron identificar las cepas aisladas como *B. abortus* biovar 1.

La caracterización molecular demostró que no estaban involucradas las cepas vacunales (cepa 19 o RB51) en la generación de los abortos.

A pesar de la implementación del Plan Nacional de Control y Erradicación de Brucelosis Bovina por parte del SENASA, que incluye la vacunación de todas las terneras entre los 3 y 8 meses de edad, y los monitoreos serológicos establecidos, la brucelosis continúa siendo una de las principales enfermedades que afecta la reproducción en los rodeos bovinos de nuestro país.

Bibliografía

1. Organización Mundial de Sanidad Animal. (2024). Brucelosis (infección por *Brucella abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*). En *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres* (Cap. 3.1.4). OMSA.
2. Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., Christou, L., & Tsianos, E. V. (2006). The new global map of human brucellosis. *The Lancet. Infectious diseases*, 6(2), 91–99. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70382-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70382-6)
3. Corbel, M. J. (2006). Brucellosis in humans and animals. World Health Organization.
4. Seleem, M. N., Boyle, S. M., & Sriranganathan, N. (2010). Brucellosis: a re-emerging zoonosis. *Veterinary microbiology*, 140(3-4), 392–398. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.06.021>
5. Gul H, Erdem H. Mandell, Douglas, and Bennett's. 2020. Principles and Practice of Infectious Diseases. 9th ed. Elsevier.
6. Pereira, C. R., Cotrim de Almeida, J. V. F., Cardoso de Oliveira, I. R., Faria de Oliveira, L., Pereira, L. J., Zangerônimo, M. G., Lage, A. P., & Dorneles, E. M. S. (2020). Occupational exposure to *Brucella* spp.: A systematic review and meta-analysis. *PLoS neglected tropical diseases*, 14(5), e0008164. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008164>
7. Moreno, E., Blasco, J. M., & Moriyón, I. (2022). Facing the Human and Animal Brucellosis Conundrums: The Forgotten Lessons. *Microorganisms*, 10(5), 942. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10050942>
8. Walker, L.R. (1999). *Brucella*. In: Hirsh, D.C. and Zee, Y.C., Eds., *Veterinary Microbiology*, Blackwell Science, USA, 196-202.
9. Ley N° 24.557. (1995, 3 de octubre). Ley de Riesgos del Trabajo. Congreso de la Nación Argentina. Boletín Oficial de la República Argentina. infoleg.gob.ar
10. SENASA, 2019. Resolución 67/2019. SENASA, Argentina
11. Godfroid, J., Nielsen, K., & Saegerman, C. (2010). Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. *Croatian medical journal*, 51(4), 296–305. <https://doi.org/10.3325/cmj.2010.51.296>
12. 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, France
13. Terzolo, H. R., Paolicchi, F. A., Moreira, A. R., & Homse, A. (1991). Skirrow agar for simultaneous isolation of *Brucella* and *Campylobacter* species. *The Veterinary record*, 129(24), 531–532.

14. 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(10), 3484–3487. <https://doi.org/10.1128/JCM.00837-08>
15. Hollender, D., Conde, S. B., Salustio, E., & Samartino, L. E. (2013). Detección de un complejo clonal con el genotipo de *Brucella abortus* biovariedad 2 como fundador en aislamientos de *B. abortus* de Argentina [Detection of a clonal complex with *Brucella abortus* biovar 2 genotype as founder in *B. abortus* isolates from Argentina]. *Revista Argentina de microbiología*, 45(4), 229–239. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(13\)70029-4](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(13)70029-4)

Agradecimiento

Al Dr. Luis Fazzio por los aportes realizados en este artículo

Declaraciones

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de interés respecto de la publicación del presente trabajo.

Contribuciones de autores

Todos los autores contribuyeron a la concepción y el diseño del estudio. La preparación del material, la recopilación y el análisis de datos fueron realizados por los mismos. El primer borrador del manuscrito fue escrito por Ariel Koval y todos los autores comentaron las versiones anteriores del manuscrito. Todos los autores leyeron y aprobaron el manuscrito final. Supervisión: Sebastian Elena.