

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE *CAMPYLOBACTER FETUS* POR  
CULTIVO Y REAL TIME PCR**

**por**

**María Sofía BARROS MAYOL  
Alfonso SILVA RODRÍGUEZ**

TESIS DE GRADO presentada como uno  
de los requisitos para obtener el título  
de Doctor en Ciencias Veterinarias  
Orientación: Producción Animal

MODALIDAD: Ensayo experimental

MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2021

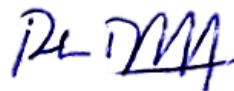
## PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa: Dr. Jorge Gil



Segundo miembro (Tutor): Dr. Rafael Delpiazzo



Tercer miembro: Dr. Kevin Yaneselli



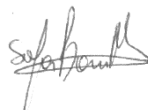
Cuarto miembro (Co-tutora): Dra. Lucía Calleros



Fecha:

27-07-2021

Autores:



María Sofía Barros Mayol

Alfonso Silva Rodríguez

## DEDICATORIA

*“A nuestras familias por el apoyo brindado durante todos estos años y al gran equipo de trabajo detrás de este proyecto”*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Facultad de Veterinaria y sus profesores, por nuestra formación como profesionales y personas, a nuestro tutor y co-tutora, por el apoyo brindado en cada etapa de este largo trabajo, también a Maila Barcellos por su colaboración y paciencia. Al Frigorífico Schneck, por abrirnos sus puertas para poder realizar el muestreo de los animales. Por último y no menos importante, a nuestras familias y amigos que nos han apoyado y motivado en este largo camino, creyendo en nosotros en todo momento, este logro es gran parte gracias a ellos.

A todos, GRACIAS.

## TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN .....	2
DEDICATORIA .....	3
AGRADECIMIENTOS .....	4
LISTA DE ABREVIATURAS .....	6
RESUMEN.....	7
SUMMARY .....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	10
<b>2.1 <i>Campylobacter fetus</i></b> .....	10
<b>2.2 La campilobacteriosis genital bovina</b> .....	10
<b>Etiología, transmisión y patogenia</b> .....	10
<b>Signos clínicos</b> .....	11
<b>Diagnóstico</b> .....	11
<b>Técnicas de diagnóstico</b> .....	13
<b>Sensibilidad y Especificidad</b> .....	15
3. HIPOTESIS .....	16
4. OBJETIVOS .....	17
<b>Objetivo general</b> .....	17
<b>Objetivos específicos</b> .....	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	18
<b>5.1 Obtención de muestras</b> .....	18
<b>5.2 Procesamiento en Laboratorio</b> .....	18
<b>5.3. Análisis estadístico</b> .....	19
6. RESULTADOS .....	20
7. DISCUSION.....	22
8. CONCLUSIONES .....	25
10. BIBLIOGRAFIA.....	26
10. ANEXOS.....	31

## LISTA DE ABREVIATURAS

AFLP: Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos Amplificados

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARNr: Ácido Ribonucleico Ribosomal

Cff: *Campylobacter fetus* subespecie *fetus*

Cft: *Campylobacter fetus* subespecie *testudinum*

Cfv: *Campylobacter fetus* subespecie *venerealis*

CGB: Campilobacteriosis Genital Bovina

CT: Ciclo Umbral de la PCR en tiempo real

IFD: Inmunofluorescencia Directa

MLST: Tipificación Multilocus de Secuencias

pb: Pares de Bases

PBS: Buffer Fostafo Salino

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PFGE: Electroforesis en Gel de Campo Pulsado

qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real

RAPD: Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico

## RESUMEN

Gran parte de la economía de nuestro país es está basada en la ganadería y concretamente en la cría vacuna. Históricamente se han registrado porcentajes de preñez que oscilan entre el 65% y 82%. Los factores que influyen en dichos porcentajes son múltiples, pero uno de ellos son las enfermedades de transmisión venérea, como es el caso de la Campilobacteriosis Genital Bovina causada por la bacteria *Campylobacter fetus venerealis*. Las dificultades en los análisis de laboratorio para el correcto diagnóstico de la enfermedad fue lo que originó este experimento. El objetivo fue comparar dos técnicas de diagnóstico a partir de la misma muestra de esmegma prepucial, la Reacción en Cadena de Polimerasa en Tiempo Real (qPCR) con la técnica de Cultivo y Aislamiento (técnica *gold standard*), para poder estimar la sensibilidad y especificidad de la qPCR. Se obtuvieron 277 muestras de esmegma prepucial de diferentes toros de descarte enviados a faena en el Frigorífico Schneck, provenientes de 48 establecimientos diferentes. Las muestras fueron analizadas y procesadas siguiendo con todas el mismo protocolo. Se sembraron en medio de cultivo Skirrow y se realizó la qPCR en el la Sección Genética Evolutiva de Facultad de Ciencias dentro de las 6 horas luego de obtenidas en todos los casos. Se obtuvieron 6 cultivos y aislamientos positivos de *C. fetus*, y 271 cultivos negativos. A su vez, se obtuvieron 7 reacciones de qPCR positivas y 270 reacciones negativas. De los 48 establecimientos de origen, se obtuvieron 5 positivos por cultivo y aislamiento, y 6 positivos a qPCR. La sensibilidad estimada fue de 83,3 % (entre 45,2% y 100%), y la especificidad del 99,3% (entre 98,1% y 100%). El valor de concordancia *kappa* fue de 0,76 (error estándar de 0,13). Se obtuvo una proporción de 2,2% de toros portadores de *C. fetus* por cultivo y aislamiento y de 2,5% por qPCR, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas. También se obtuvo una proporción de 10,4% de establecimientos con presencia de *C. fetus* por cultivo y del 12,5% por qPCR sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los dos resultados. En conclusión, la qPCR es adecuada como técnica de *screening* para detectar *C. fetus* de forma directa del esmegma prepucial, además la bacteria sigue estando presente en Uruguay en establecimientos de diferentes regiones y orientaciones ganaderas.

## SUMMARY

A large part of the economy of our country is based on livestock and specifically on breeding cattle. Historically, pregnancy rates have been between 65% and 82%. The factors that influence these percentages are multiple, but one of them is venereal diseases, such as Bovine Genital Campylobacteriosis caused by the bacterium *Campylobacter fetus venerealis*. The difficulties in the laboratory analysis for the correct diagnosis of the disease was what originated this experiment. The objective was to compare two diagnostic techniques from the same sample of preputial smegma, the Real Time Polymerase Chain Reaction (qPCR) with the Culture and Isolation technique (gold standard technique), in order to estimate the sensitivity and specificity of the qPCR. 277 samples of preputial smegma were obtained from different discard bulls sent to slaughter at Frigorífico Schneck, from 48 different farms. The samples were analyzed and processed following the same protocol with all of them. They were sown in Skirrow culture medium and qPCR was performed at the Evolutionary Genetics Section of the Faculty of Sciences within 6 hours after being obtained in all cases. 6 positive cultures and isolates of *C. fetus* were obtained, and 271 negative cultures. In turn, 7 positive qPCR reactions and 270 negative reactions were obtained. From the 48 different farms, 5 were positive for culture and isolation, and 6 positives for qPCR. The estimated sensitivity was 83.3% (between 45.2% and 100%), and the specificity was 99.3% (between 98.1% and 100%). The kappa concordance value was 0.76 (standard error 0.13). A proportion of 2.2% of bulls with *C. fetus* was obtained by culture and isolation and of 2.5% by qPCR, without finding statistically significant differences. A proportion of 10.4% of establishments with the presence of *C. fetus* by culture and 12.5% by qPCR was also obtained, without finding statistically significant differences between the two results. In conclusion, qPCR is suitable as a screening technique to detect *C. fetus* directly from the preputial smegma, in addition the bacterium continues to be present in Uruguay in establishments in different regions and livestock orientations.



## 1. INTRODUCCIÓN

En el país hay más de 40.000 establecimientos ganaderos, ocupando cerca de 15 millones de hectáreas de pastoreo, siendo la gran mayoría predios familiares y de explotación mixta, es decir cría de vacunos y lanares en el mismo predio. Estos establecimientos se ubican principalmente en centro, norte y este del país. Uruguay es de los países que tienen una mayor relación de vacunos y ovinos por habitante (casi 4 vacunos/habitante) y son mayormente criados en condiciones de campo natural (MGAP-DIEA, 2019). Esto último sumado a que además es uno de los países libres de Encefalopatía Espongiforme Bovina (OIE, 2020) y que cada ternero cuenta con trazabilidad individual, permitiendo su rastreo desde el nacimiento hasta etapas de industrialización y comercio, hacen que los productos cárnicos sean reconocidos por su excelencia a nivel internacional. A pesar de su reducida superficie el país se encuentra entre los 10 principales exportadores de lana peinada, leche en polvo y carne vacuna congelada en el mundo (ITC Trade Map, 2020). Sin embargo, los índices de procreo en rodeos de carne uruguayos se han considerado bajos los últimos años (MGAP-DIEA, 2019). Dentro de las causas que influyen negativamente en el comportamiento reproductivo, se hallan factores nutricionales, de manejo e infecciosos. En este último, las enfermedades infecciosas causantes de trastornos reproductivos, como infertilidad, aborto y pérdidas perinatales tienen gran importancia económica y sanitaria (Easton, 2006).

La Campilobacteriosis Genital Bovina se encuentra dentro de las principales enfermedades infecciosas que afectan la reproducción en la región. *Campylobacter fetus* fue uno de los dos agentes bacterianos causantes de aborto más aislados por Campero et al. (2003) en Argentina. De la misma manera Easton (2006) destaca su gran incidencia dentro de los agentes bacterianos aislados provenientes de fetos abortados en Uruguay. Los toros son los principales difusores y reservorios de la enfermedad pese a actuar de manera asintomática no afectándose la libido ni la calidad espermática. Por dichas razones esta debería ser la categoría objetivo a la hora de diagnosticar la enfermedad en los rodeos (Silveira et al. 2018).

Dentro de las técnicas disponibles para su diagnóstico se encuentran el cultivo y aislamiento, considerada la técnica *gold standard*, y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) a tiempo final y tiempo real (qPCR). Las muestras pueden obtenerse de tres formas distintas cuando existe sospecha de la enfermedad, estas son: esmegma prepucial de toros, mucus cérvico-vaginal de hembras vacías y/o que hayan abortado y muestras de feto abortado (placenta, líquido abomasal, pulmón e hígado) (OIE, 2018).

Iraola et al. (2016) desarrollaron en Uruguay una qPCR que se dirige a una región única del gen 16S ARNr de *C. fetus*, con una sensibilidad de 100% obtenida a partir de cepas de *C. fetus*, y una especificidad de 100% (con un intervalo de confianza del 95%), sin reacción cruzada con otras especies bacterianas. El fundamento de este experimento es poder comparar una prueba de detección rápida (qPCR), con la técnica de cultivo y aislamiento a partir de la misma muestra de esmegma prepucial, con el fin de estimar la sensibilidad y especificidad de la qPCR. De esta manera, se estima poder establecer un protocolo estándar de diagnóstico como resultado de la información generada (Delpiazzi, 2018).

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Campylobacter fetus*

*Campylobacter fetus* es una bacteria gram negativa perteneciente al phylum Proteobacteria, el más numeroso de todo el dominio Bacteria. Dentro de dicho phylum, las épsilon proteobacterias son la clase más pequeña y menos diversa. Dentro de ésta, la familia Campylobacteraceae incluye los géneros *Aliarcobacter*, *Arcobacter*, *Arcomarinus*, *Halarcobacter*, *Malaciobacter*, *Poseidonibacter*, *Pseudoarcobacter*, *Campylobacter*, *Candidatus Thioturbo* y *Sulfurospirillum* (NCBI, 2021). Obtienen su energía principalmente de aminoácidos o intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Su hábitat es muy variable, desde tracto gastrointestinal de los animales hasta yacimientos petrolíferos o las fuentes hidrotermales (Eppinger et al. 2004; Gupta, 2006).

El género *Campylobacter* está compuesto por bacterias con las siguientes características diagnósticas: Gram negativas, forma alargada, curvada o en espiral que les da su nombre (del griego *campylo*: curvado), móviles gracias a la acción de uno o dos flagelos polares, con metabolismo respiratorio de aminoácidos e intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, no fermentan ni oxidan carbohidratos, la mayoría microaerófilicos, las temperaturas óptimas de crecimiento varían entre 25 y 42°C (Penner, 1988). *Campylobacter fetus* es una de las 50 especies actualmente conocidas del género (LPSN, 2021), tiene forma alargada y curvada, mide 0,2 a 0,8 micras de ancho y 0,5 a 5 micras de largo; luego de 72 horas en placas de agar-sangre forma pequeñas colonias que varían en color desde blanco brillante hasta marrón claro. Necesita una atmósfera con 10% de dióxido de carbono y 5% de oxígeno para su crecimiento (Kiggins y Plastridge, 1958; George et al. 1978; Alves et al. 2011,). Es capaz de crecer a 25°C, 37°C y 42°C (siendo más lento su crecimiento a esta última temperatura).

*Campylobacter fetus* se divide en tres subespecies: *C. fetus* subsp. *venerealis* (Cfv), *C. fetus* subsp. *fetus* (Cff) y *C. fetus* subsp. *testudinum* (Cft). Cff y Cfv fueron definidas por características ecológicas (preferencias de nicho, hospedero y presentación clínica). Cft posee una gran divergencia genética con respecto a Cff y Cfv; además de presentarse en reptiles, es capaz de infectar humanos (Dingle et al. 2010; Patrick et al. 2013; Fitzgerald et al. 2014). Cfv causa infertilidad crónica y abortos, se encuentra exclusivamente en el tracto genital bovino, transmitiéndose vía venérea, no pudiendo sobrevivir en tracto digestivo (Bryner et al. 1964). Cff causa abortos esporádicos en bovinos y ovinos, transmitida vía oro-fecal, aunque también puede habitar tracto genital y transmitirse vía venérea de forma esporádica (Veron y Chatelain, 1973). La subespecie *testudinum* es hallada en humanos y reptiles y no puede ser diferenciada por pruebas fenotípicas convencionales, a la vez que presenta similitud en la secuencia del gen 16S propia de la especie (Fitzgerald et al. 2014).

### 2.2 La campilobacteriosis genital bovina

#### Etiología, transmisión y patología

La campilobacteriosis genital bovina (CGB) es una enfermedad bacteriana, de transmisión venérea que provoca repetición de celos, infertilidad temporaria y abortos esporádicos; siendo su agente etiológico *Campylobacter fetus venerealis* (Cfv), aunque también puede encontrarse ocasionalmente Cff en el tracto genital tanto de hembras como de machos. Debido a que Cff es capaz de provocar abortos esporádicos, es conveniente contar con un método de diagnóstico que detecte ambas subespecies.

La transmisión clásica ocurre por monta natural, aunque también se conoce del contagio por inseminación artificial a través del uso de semen contaminado (Mshelia et al. 2010). Además, se reportaron casos donde el inseminador, en etapas previas a la inseminación en sí misma, buscando signos secundarios de celo mediante la introducción de la mano enguantada en vagina y posteriormente realizando el mismo procedimiento en varias hembras sin haber cambiado de guantes (BonDurant, 2005). En el caso de las vacas, se ha descrito que luego de la invasión de *C. fetus* hacia el útero, se produce una respuesta inflamatoria leve de la pared uterina, que hace de este un ambiente inhóspito para el embrión (Peterson y Newsam, 1964; Clark, 1971; Schurig et al. 1974; Silveira et al. 2018).

Por otra parte, el macho puede infectarse al montar una vaca infectada o al utilizar una vagina artificial contaminada para la extracción de semen. En las criptas de la región prepucial, *C. fetus* encuentra las condiciones microaerofílicas adecuadas para su crecimiento y multiplicación. A mayor profundidad de criptas, mejores las condiciones para el crecimiento de esta bacteria, condición que se ve favorecida a mayor edad del toro. El toro queda como portador asintomático, no habiendo invasión sistémica ni a otros órganos reproductores (Samuelson y Winter, 1966; Corbeil, 1999; Balzan et al. 2020). Si hay un toro infectado en un rodeo donde se utiliza 1 toro cada 40 vacas (2,5% de toros), el 60% de las vacas estarían siendo infectadas en un solo ciclo estral (Newsam, 1960).

### **Signos clínicos**

Clínicamente en las hembras se manifiesta con una vaginitis, cervicitis, salpingitis y endometritis, lo que provoca fallas en la implantación del embrión (Schurig et al. 1974). Es de transmisión venérea, siendo el toro infectado el principal dispersor de la enfermedad, ya sea por monta natural o por inseminación artificial (Mshelia et al. 2010; Molina et al. 2013). Algo característico de esta enfermedad, es encontrarse vacas ya servidas retornando al estro, vemos en estos rodeos repetición de celos e intervalos entre servicios más largos de lo normal, lo que al final se evidencia con bajas tasas de preñez, pudiendo ser tan bajas como del 10 al 30%, en un período de entore de 60 días. Después de retornar al celo unas 2 a 4 veces, algunas vacas pueden quedar preñadas y mantener la gestación, pero siempre un bajo porcentaje de ellas aborta entre el 4<sup>o</sup> y 7<sup>o</sup> mes de gestación. Los abortos presentan lesiones inespecíficas, como proliferación linfoide y acumulación focal de células mononucleares en la mayoría de los órganos (Jeffrey y Hogg, 1988).

### **Diagnóstico**

Partiendo de una correcta anamnesis y la presencia de los signos clínicos podemos considerar la patología en el rodeo, pero para un diagnóstico definitivo se requiere confirmar la presencia del agente etiológico mediante análisis de laboratorio.

### **Muestras**

Hay tres muestras distintas que pueden tomarse cuando se sospecha la enfermedad: esmegma prepucial de toros, mucus cérvico-vaginal de hembras (vacías o que hayan abortado), y muestras de feto abortado (placenta, líquido abomasal, pulmón e hígado de feto abortado). Por otra parte, también hay tres técnicas de diagnóstico principalmente: cultivo y aislamiento, reacción en cadena de polimerasa (PCR) a tiempo final y en tiempo real e Inmunofluorescencia directa (IFD).

Comúnmente el diagnóstico de rutina se realiza a partir de muestras del macho, por la practicidad. Además, es económico ya que se toman menos muestras por

representar los toros un menor porcentaje del rodeo (Terzolo et al. 1992). La obtención de muestras de esmegma proveniente de los toros se puede obtener por aspiración, lavado, raspaje (Tedesco et al. 1977; Terzolo et al. 1992) o hisopado (Briano et al. 1973, citado por Terzolo et al. 1992).

La toma de muestras mediante aspiración, o método de la pipeta, ha ido cambiando a lo largo de los años. Se solían utilizar las pipetas de Barlett (1949) (Terzolo et al. 1992), un tubo de vidrio de 54cm con uno de sus extremos biselado, el cual era introducido en la cavidad prepucial al tiempo que en el otro extremo se le colocaba un tubo de látex por donde se aspiraba el material. Actualmente se utilizan las vainas azules descartables de Cassou empleadas en inseminación artificial con pastillas junto con el dispositivo metálico de 45 cm por el cual se acopla (Terzolo et al. 1992).

El método del lavado consiste en introducir una solución a la cavidad prepucial y, manteniendo cerrado el orificio prepucial manualmente, masajear vigorosamente por 1 minuto (Tedesco et al. 1977, Terzolo et al. 1992). Para ello se utiliza una pipeta de inseminación artificial a la que se le conecta un tubo de látex. Dicho tubo esta adosado por su otro extremo a un frasco o jeringa que contiene la solución PBS (Buffer Fosfato Salino), y tras masajear se deja caer la muestra por gravedad a través de la goma (Terzolo et al. 1992).

En cuanto al raspaje fue descrito por Tedesco et al. (1977) siguiendo el trabajo de Sutka y Katai (1969) que usaba un instrumento metálico de 70 cm de largo y 3mm de ancho que tenía soldado un extremo de 13 cm de largo y 8 mm de ancho y contaba con 31 ranuras circulares para facilitar la acción de raspado a nivel de pliegues prepuciales. Este objeto, previo lavado del orificio prepucial, era introducido y guiado al aspecto antero-dorsal del pene y una vez ingresado se procedía al raspaje con aproximadamente 20 movimientos en sentido antero-posterior. Una vez retirado para tomar la muestra se lavaba el instrumento en tubos de 8ml de caldo de peptona. Para su esterilización se lo sumergía en agua hirviendo por 5 minutos y posterior enjuague (Tedesco et al. 1977). La modificación realizada actualmente consiste en utilizar raspadores de plástico descartables, uno por animal; se higieniza el orificio prepucial, se recortan pelos, se lava con suero fisiológico estéril y se seca. Luego se procede a introducir el raspador en cavidad prepucial, evitando contactar con pelos y parte externa del prepucio, se efectúan 20-30 movimientos en sentido antero-posterior con el raspador tratando de no contactar con el pene (solamente sobre prepucio y sus pliegues) (Tedesco et al. 1977), extraer el raspador tratando de no tocar pelos y parte externa del prepucio.

El trabajo de Tedesco et al. (1977), cuyo autor comparó los tres métodos hasta aquí mencionados, concluyó que el raspaje fue el que obtuvo mayor proporción de placas con menor contaminación y el de más aislamientos exitosos.

Finalmente, el hisopado utiliza una torunda de gasa adosada a un mango de madera para frotar la mucosa prepucial. (Briano et al. 1973, citado por Terzolo et al. 1992). Los autores lo describen como poco práctico a nivel de campo, sin embargo, mencionan su posible utilidad en toros donantes de semen aprovechando el momento del salto para tomar la muestra (Gibson et al. 1970, citado por Terzolo et al. 1992).

Los toros son portadores asintomáticos y diseminadores de la enfermedad, por lo tanto, son de elección a la hora de obtener muestras para el diagnóstico de CGB en predios endémicos. *Cfv* establece una colonización persistente en las criptas prepuciales, por lo tanto, para la detección y aislamiento del agente, sería adecuado tomar las muestras preferentemente del prepucio de toros afectados (Silveira et al. 2018).

En el caso de las hembras, se obtienen muestras de mucus cérvico-vaginal de vacas vacías o que hayan abortado. Las muestras pueden obtenerse por aspiración o lavado de la cavidad vaginal. Para la aspiración, se higieniza la zona vulvar y se introduce en la cavidad vaginal una pipeta de inseminación artificial o una pipeta de Cassou (vaina azul), alcanzando la parte superior el cuello uterino (Campero et al., 2003). Se succiona suavemente, mientras se mueve la pipeta hacia adelante y hacia atrás, se retira la pipeta y ese mucus recogido se inocula directamente en un medio de cultivo o en un medio de transporte y enriquecimiento. El Mucus puede ser recogido también mediante el lavado de la cavidad vaginal, para esta técnica, se introducen en la cavidad 20-30ml de PBS con una jeringa unida a una pipeta de inseminación artificial. El líquido es aspirado y reintroducido en la cavidad unas cuatro o cinco veces previo a recogerlo y extenderlo directamente en un medio de cultivo o añadirlo a un medio de transporte y enriquecimiento. Es posible la colección de líquido de lavado vaginal con un tampón o gasa estéril, mantenidos en la vagina por 5-10 minutos después de introducir PBS. Las muestras obtenidas por succión, pueden diluirse con PBS o, sembrarse directamente en un medio de cultivo o de transporte y enriquecimiento. También se pueden obtener muestras de fetos abortados, para ello se recomienda obtener muestras asépticas de placenta, líquido abomasal, pulmones e hígado del feto, siendo estas las mejores muestras para el aislamiento de *C. fetus*. Deben colectarse en forma aséptica y ser inoculadas en un medio de transporte y enriquecimiento, o en PBS con 1% de formalina, para llevar a cabo la Inmunofluorescencia indirecta (IFI) (OIE, 2018). También es recomendado enviar el feto entero al laboratorio para realizarle la necropsia completa, permitiendo sacar una muestra menos contaminada. Ya que normalmente el tracto digestivo fetal es estéril asegurará la supervivencia del posible agente etiológico durante unas horas (Terzolo, 1992). La calidad de las muestras remitidas resulta fundamental para la confirmación del diagnóstico etiológico, tanto por su estado de conservación como su llegada en tiempo y forma al laboratorio (Easton, 2006).

### **Técnicas de diagnóstico**

La técnica de cultivo y aislamiento, conocida como *gold standard*, es muy específica, aunque resulta un proceso lento, costoso y poco práctico debido a las características biológicas de *C. fetus*, las muestras prepuciales y vaginales muestran morfología característica luego de 48hs en condiciones de microaerofilia. Este tipo de cultivos son susceptibles al pronto desarrollo de contaminantes debido al lento y difícil desarrollo de las colonias de *C. fetus* que compite con organismos de multiplicación más rápida (McMillen et al. 2006), lo que no brinda una gran precisión a la hora del diagnóstico. En la actualidad hay muchos medios de cultivo en uso para el diagnóstico bacteriológico de la CGB. La mayoría de los medios contienen cicloheximida (antifúngico) que, por su posible toxicidad, este puede sustituirse por anfotericina B. Como medio selectivo para el aislamiento de *Campylobacter fetus*, se recomienda el Skirrow, se trata de un medio basado en sangre, con 5-7% de sangre lisada, desfibrinada que contiene los siguientes agentes selectivos: sulfato de polimixina B (2,5 UI/ml), trimetoprim (5 µg/ml), vancomicina (10 µg/ml) y cicloheximida (50 µg/ml). Como alternativa, puede utilizarse un medio no selectivo basado en sangre (5-7%) combinado con la filtración (0,65 µm), pero puede ser menos sensible que un medio selectivo (OIE, 2018). Las placas se incuban a 37°C y una atmósfera microaerobia de 5-10% de dióxido de carbono y de preferencia un 5-9% de hidrógeno para un crecimiento óptimo (Vandamme, 2000). Los métodos de microaerofilia pueden variar de un laboratorio a otro, en algunos se crea una atmósfera adecuada, sustituyendo

gas en una jarra. Existen kits a la venta para generar el gas, también incubadoras de atmósfera variable. En el cultivo e incubación, deben utilizarse en forma sistemática cepas control de *C. fetus* subsp. *fetus* y *C. fetus* subsp. *venerealis*.

Para el diagnóstico mediante Inmunofluorescencia directa (IFD), sería de esperar una alta sensibilidad, siendo más directa la detección, sin tener que recurrir al cultivo microbiológico, pero la desventaja de esta técnica es que no posee la capacidad de diferenciar la subespecie actuante de *C. fetus*, y su especificidad es limitada.

A través de ensayos bioquímicos se puede diferenciar el *C. fetus* a nivel de subespecies en *fetus* y *venerealis*. Mientras que Cff es capaz de desarrollarse con un 1% de glicina, el Cfv no tolera dicha concentración en el medio siendo positivo y negativo a esta prueba respectivamente. (Veron y Chatelain 1973, Penner 1988, Calleros 2015). De la misma manera el Cff es capaz de producir sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) en medio enriquecido con cisteína y no así el Cfv (Penner 1988, Calleros 2015). Para la caracterización genética de *Campylobacter*, se puede realizar la amplificación de un fragmento del gen 16S con cebadores de regiones con secuencias exclusivas del género (Linton et al. 1996). En los últimos años, se desarrollaron métodos basados en PCR en tiempo real (qPCR) (Mcmillen et al. 2006; Chaban et al. 2009,). Se desarrolló un método de identificación de la especie basado en el gen *cpn60*, que codifica para una chaperonina de 60 kDa, utilizando SYBR Green (Chaban et al. 2009). Otro método utiliza sondas de hidrólisis (TaqMan) y tiene como blanco el gen *nahE* (van der Graaf-van Bloois et al. 2013, Selim et al. 2014,). Otro método de qPCR se basa en un conjunto de cebadores que amplifica una secuencia de 78pb del gen ARNr 16S y una sonda TaqMan MGB, que se dirige a una región polimórfica de 19pb, que discrimina cepas de *C. fetus* del resto de especies de *Campylobacter* y de otras bacterias. Para la identificación de *C. fetus* mediante esta técnica, se probó con una colección de cepas de *C. fetus* aisladas de bovinos, humanos y reptiles y con cepas de varias especies de *Campylobacter* (Iraola et al. 2016).

Para la diferenciación de subespecies, se han descrito métodos basados en PCR y otros como la secuenciación del gen 16S (On & Harrington, 2001; Gorkiewicz et al. 2003), PFGE (electroforesis en gel de campo pulsado) (On & Harrington, 2001), AFLP (análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados) (Wagenaar et al., 2001) y MLST (tipificación multilocus de secuencias) (van Bergen et al., 2005a). La mayoría de los laboratorios que llevan a cabo el diagnóstico en forma habitual, les resulta de mayor utilidad la PCR. De varias PCR se ha dicho que son específicas de subespecie, como las desarrolladas por Hum et al. (1997), Wang et al. (2002), Tu et al. (2005), van Bergen et al. (2005) y Abril et al. (2007). Sin embargo, no se dispone de ninguna PCR que permita identificar con fiabilidad las cepas de *C. fetus* a nivel de subespecie (van der Graaf-van Bloois et al., 2013). La multiplex PCR descrita por Abril et al. (2007) demostró ser fiable para la correcta identificación de *C. fetus*, con un 100% de sensibilidad y un 100% de especificidad, aunque la diana específica de Cfv descrita para esta PCR da lugar a un 97% de sensibilidad y no puede emplearse para diferenciar de forma fiable entre cepas de Cff y de Cfv (van der Graaf-van Bloois et al., 2013). La diana de *C. fetus* en la que se basa esta PCR, el gen *nahE*, puede emplearse para identificar *C. fetus* y también se ha desarrollado como prueba en tiempo real (van der Graaf-van Bloois et al., 2013; McGoldrick et al., 2013). La PCR que describe Van Bergen et al. (2005) permite detectar cepas de Cfv del mismo modo que con AFLP, pero la prueba no permite identificar *C. fetus* subsp. *venerealis* biovar *intermedius*. Por lo tanto, esta PCR no es adecuada para fines de diagnóstico (van der Graaf-van Bloois et al., 2013). La PCR multiplex de Hum et al. (1997) permite amplificar un fragmento de ADN específico de *C. fetus* (aproximadamente 200 pb más pequeño que

el de 960 pb descrito en el estudio original), así como un fragmento específico de *C. fetus* subesp. *venerealis*. Mediante la comparación de esta PCR con las pruebas AFLP y MLST (van Bergen et al., 2005) y con la prueba de la glicina (Willoughby et al., 2005) se confirma que la PCR puede dar tanto falsos positivos como falsos negativos (van der Graaf-van Bloois et al., 2013). En otro estudio, esta PCR dio un resultado positivo con una cepa de *C. hyointestinalis* aislada de un toro (Spence et al., 2011). Esta observación hace que el gen diana parA específico de Cfv, y en consecuencia todas las demás PCR en las que se utilice esta diana, resulten inadecuados para el diagnóstico. La PCR descrita por Wang et al. (2002) solo proporciona un producto específico de *C. fetus* subesp. *fetus*. Estos resultados se obtuvieron tan solo con un número muy pequeño de pruebas. Las PCR para la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), descritas por Tu et al. (2005), parece que se han evaluado con un número muy pequeño de cepas de *C. fetus* subesp. *venerealis*. En comparación con las técnicas tradicionales, se puede decir que con la técnica de PCR se podría trabajar con un mayor número de muestras y en un menor tiempo, menor aún si se trata de qPCR, ya que se puede prescindir de la etapa de electroforesis, logrando además una sensibilidad mayor (Bove et al. 2013).

### **Sensibilidad y Especificidad**

Los términos de sensibilidad y especificidad fueron introducidos por Yerushalmy en 1947 como indicadores estadísticos que evalúan el grado de eficacia inherente a una prueba diagnóstica (Lorenzo, 1905; Castles, 1998; citado en manual de *Epidat 3.1*). Ambos indican la discriminación diagnóstica que tiene una prueba en relación a un criterio de referencia, que se considera la verdad (manual de *Epidat 3.1*).

La sensibilidad (S) se define como la proporción de animales con la enfermedad que resultan positivos a la prueba diagnóstica evaluada. Es decir, indica cuán "sensible" es la prueba frente a la presencia de la enfermedad. Se calcula en términos de probabilidad condicional como la probabilidad (P) de que el Test sea positivo (T+) dado que el animal efectivamente sea enfermo (Enf) o portador:  $S = P(T+/Enf)$  (Feinstein et al. 1975; Griner et al. 1981; Fescina et al. 1985; Begg et al. 1983; citados en manual de *Epidat 3.1*).

La especificidad (E) se define como la proporción de animales sanos que resultan negativos a la prueba diagnóstica evaluada, e indica la capacidad que tiene la prueba de identificar como sanos (no enfermos) a los animales que efectivamente sean sanos. También se calcula en términos de probabilidad condicional como la probabilidad (P) de que el Test sea negativo (T-) dado que el animal efectivamente es sano (no Enfermo):  $E = P(T-/no\ Enf)$  (Feinstein et al. 1975; Griner et al. 1981; Fescina et al. 1985; Begg et al. 1983; citados en manual de *Epidat 3.1*).

Este trabajo experimental tiene como objetivo poder comparar una prueba de detección rápida (qPCR; Iraola et al. 2016), con la técnica de cultivo y aislamiento (*gold standard*) a partir de la misma muestra de esmegma prepucial, a fines de estimar la sensibilidad y especificidad de la qPCR. De esta manera, se estima poder establecer un protocolo estándar de diagnóstico como resultado de la información generada (Delpiazzo, 2018).

### **3. HIPOTESIS**

La sensibilidad y especificidad de la técnica de qPCR desarrollada por Iraola et al. (2016) para la detección de *Campylobacter fetus* son comparables a las de los métodos de cultivo y aislamiento.

*Campylobacter fetus* se encuentra presente en toros de Uruguay.



## 4. OBJETIVOS

### Objetivo general

Contribuir a la validación de una técnica de qPCR para la detección rápida de *Campylobacter fetus* desarrollada por Iraola et al. que se dirige a una región única del gen 16S ARNr en muestras de esmegma prepucial bovino.

### Objetivos específicos

- Identificar cepas de *Campylobacter fetus* por cultivo y aislamiento y por qPCR a partir de las mismas muestras de esmegma prepucial de toros de descarte enviados a faena de distinta procedencia.
- Comparar los resultados obtenidos entre ambos métodos de diagnóstico utilizados, estimando la sensibilidad y especificidad de la qPCR.
- Estimar de la proporción de toros y establecimientos positivos por cultivo y por real time PCR en la muestra obtenida.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron en total 6 muestreos, obteniendo 277 muestras de esmegma prepucial de toros de 48 orígenes diferentes, de distintas edades y razas.

Se registró cada muestra obtenida en una base de datos, asignando a cada muestreo un código por orden alfabético, y luego un número correlativo a cada muestra (por ejemplo, AD1, AD2, AD3; AE1, AE2, AE3, etc.). Se registró el número de caravana individual del toro, el DICOSE físico del establecimiento de origen, departamento, seccional policial, fecha de muestreo, y luego los resultados de cada muestra para el cultivo y aislamiento, y qPCR.

### 5.1 Obtención de muestras

Los muestreos se realizaron en la planta de faena habilitada del Frigorífico Schneck S.A (Camino Carmelo Colman 4598, Montevideo, Uruguay).

La técnica de obtención de la muestra de esmegma prepucial consistió en obtener durante la faena la parte completa de pene y prepucio. Inmediatamente después, en una sala aparte, se exteriorizó el pene ayudado de una pinza en el glande para exponer la mucosa prepucial completa. Luego se raspó la mucosa con una espátula o cuchara descartable, obteniendo el esmegma prepucial con la menor contaminación posible (modificado de Briano et al. 1973, citado por Terzolo et al. 1992). Esa espátula fue descargada en tubos individuales identificados, con 4 ml de PBS y puestos en conservadora de isotérmica sin refrigerante (Delpiazzo, 2018).

### 5.2 Procesamiento en Laboratorio

#### Aislamiento y cultivo

Las muestras se sembraron en el Laboratorio de Genética de Microorganismos de la Sección Genética Evolutiva de Facultad de Ciencias dentro de las 6 horas de obtenidas en todos los casos. En dicho laboratorio se sembraron 100 µl de cada muestra en Medio Skirrow (OIE, 2018), se incubaron a 37 °C en atmósfera microaerofílica (CampyGen®, 5-10% de oxígeno, 5-10% de dióxido de carbono y 5-9% de hidrógeno) durante 7 días, con observación de las placas cada 48 horas. En ese momento se observaron las colonias presentes al microscopio por contraste de fases, realizando la resiembra correspondiente de las colonias sospechosas de *C. fetus* en medio de cultivo Agar sangre Columbia (OXOID), continuando con su observación y replaqueo cada 48 horas en búsqueda de su aislamiento. Las colonias obtenidas se conservaron en caldo Brucella con glicerol al 17% a -80°C.

#### Análisis molecular

Se realizó la qPCR de las muestras en el Laboratorio de Genética de Microorganismos de la Sección Genética Evolutiva de Facultad de Ciencias, siguiendo el protocolo descrito y publicado por Iraola et al. (2016).

Se utilizaron un par de cebadores que amplifican una secuencia 78-bp del gen 16S ARNr (16SFw: 5'-GC ACCTGTCTCAACTTTC-3' y 16SRv: 5'-CCTTACCT GGGCTTGAT-3') y una sonda TaqMan-MGB (16SPb: 5'-VIC-ATCTCTAAGAGATTAGTTG-MGB/NFQ-3') que hibrida con una región polimórfica de 19 pb que detecta cepas de *C. fetus* diferenciándola de otras especies tanto de *Campylobacter* como de otras bacterias.

Se realizó la extracción de ADN con un método de calor *fastboiling* rápido partiendo de 500 µL de esmegma prepucial (Schunk et al. 1995). Las muestras se agruparon en

pooles de a 5 muestras cada uno. La reacción de qPCR se realizó por duplicado con un volumen final de 25  $\mu$ L, que contenía 1  $\times$ HotRox Master Mix (Bioron), 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.3  $\mu$ M de cada cebador, 0.1  $\mu$ M de la sonda TaqMan-MGB (Applied Biosystems) y 1 a 5  $\mu$ L del ADN correspondiente a las muestras. El ciclado se realizó en un equipo ABIPrism 7500 (Applied Biosystems).

Cuando se detectó algún pool positivo, se repitió la qPCR con cada muestra individual que formaba ese pool para identificar la muestra positiva.

Para determinar la positividad de las muestras individuales así como de los pooles se compararon los valores CT siendo el límite inferior establecido en 10<sup>2</sup> copias de genoma por reacción, lo que equivale a un valor CT de 37 (Iraola et al., 2016). Por lo tanto aquellas muestras con valor CT menor a 37 fueron consideradas positivas.

En cada una de las qPCR realizadas se incluyeron controles positivos (extracciones de ADN realizadas a partir de cultivos puros de *C. fetus*) y blancos de PCR.

### **5.3. Análisis estadístico**

Los cálculos de sensibilidad y especificidad de la qPCR, utilizando como referencia el aislamiento, y el valor de concordancia kappa entre ambas técnicas (Thrusfield, 1995), se calcularon utilizando el software Epidat 3.1.

La estimación del porcentaje de positivos se realizó por el método de Wilson Score, estableciendo la media estimada, y los rangos entre el límite inferior y límite superior, con un intervalo de confianza del 95% (Wilson, 1927; Boomsma, 2005). Se consideró que hubo diferencia estadísticamente significativa cuando no coincidió ningún valor en la comparación entre los rangos del límite inferior y el límite superior.

## 6. RESULTADOS

Se obtuvieron 277 muestras de esmegma prepucial de diferentes toros, de 48 establecimientos diferentes. De estas 277 muestras, se obtuvieron 6 cultivos y aislamientos positivos de *C. fetus*, y 271 cultivos negativos. A su vez, se obtuvieron 7 reacciones de qPCR positivas y 270 reacciones negativas. Las 2 muestras que dieron positivo a qPCR pero no se obtuvo crecimiento en los medios de cultivo fueron la AD35 y AF 26. En la muestra AD 29 se obtuvo aislamiento por cultivo, pero la qPCR dio negativo (Cuadro 1). De los 48 establecimientos de origen, se obtuvieron 5 positivos por cultivo y aislamiento, y 6 positivos a qPCR.

### Estimación de la sensibilidad y especificidad de la qPCR y valor *kappa*

Para la estimación de la sensibilidad y especificidad de la qPCR, se tomó como referencia de “animales enfermos” a los positivos por cultivo y aislamiento, obteniendo una sensibilidad del 83,3% (entre 45,2% y 100%). A su vez, se tomó como referencia de “animales sanos” a los negativos por cultivo y aislamiento, obteniendo una especificidad del 99,3% (entre 98,1% y 100%) con un intervalo de confianza del 95% (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Resultados utilizados como referencia para la estimación de la sensibilidad y especificidad de la real time PCR.

qPCR	Cultivo		
		Enfermo	Sano
	Positivo	5	2
Negativo	1	269	270
	6	271	<b>277</b>

El valor de concordancia *kappa* obtenido al comparar ambas técnicas diagnósticas fue de 0,76 con un error estándar de 0,13 con un intervalo de confianza de 95%.

### Estimación del porcentaje de positivos en la muestra

Se obtuvo una proporción de 2,2% de toros portadores de *C. fetus* por cultivo y aislamiento (6 toros positivos de 277), y de 2,5% por qPCR (7 toros positivos de 277), sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los dos resultados, con un intervalo de confianza del 95%. (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Estimación de la **proporción de toros positivos** por cultivo y por real time PCR, **en la muestra obtenida** con un intervalo de confianza del 95%.

Toros	% límite inferior	% de positivos	% límite superior
Positivos por cultivo	1,0%	<b>2,2%</b>	4,6%
Positivos por qPCR	1,2%	<b>2,5%</b>	5,1%

También se obtuvo una proporción de 10,4% de establecimientos con presencia de *C. fetus* por cultivo y aislamiento (5 establecimientos positivos de 48), y del 12,5% por qPCR (6 establecimientos positivos de 48), sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los dos resultados, con un intervalo de confianza del 95% (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Estimación de la **proporción de establecimientos positivos**, por cultivo y por real time PCR, a partir **de la muestra obtenida** (48 establecimientos diferentes), con un intervalo de confianza del 95%.

<b>Establecimientos</b>	<b>% límite inferior</b>	<b>% de positivos</b>	<b>% límite superior</b>
Positivos por cultivo (n = 5)	4,5%	<b>10,4%</b>	22,2%
Positivos por qPCR (n = 6)	5,9%	<b>12,5%</b>	24,7%

## 7. DISCUSION

La comparación de la qPCR, descrita por Iraola et al. (2016) utilizada en nuestro trabajo, con los resultados de las mismas muestras con la técnica *gold standard* de cultivo y aislamiento fue útil para establecer un resultado estimado de la sensibilidad y especificidad de la qPCR realizada directamente a partir de muestras de esmegma prepucial.

En cuanto a las muestras obtenidas, creemos que se obtuvieron muestras de forma más aséptica en comparación con las muestras obtenidas de toros vivos (menor movimiento, tierra del lugar de campo), también al ser muestras de toros de descarte, eso nos da la pauta de que haya mayores probabilidades de aislar la bacteria en comparación con un rodeo de toros sanos evaluados a campo.

Los resultados de este trabajo confirman que *C. fetus* se encuentra presente en muestras de esmegma prepucial de toros de descarte enviados a faena. Esto coincide con los datos aportados en 2005 por Repiso et al. (2005) y con la información reportada hace 51 años cuando se aisló por primera vez *C. fetus* en Uruguay (Stella y Canavez, 1971). Si bien la estrategia de muestreo de este trabajo fue útil para obtener una estimación del porcentaje de positivos a *C. fetus*, sería útil poder realizar un muestreo con mayor cantidad de muestras en todo el país que sea representativo de la población, para poder tener una estimación más exacta de la prevalencia, de la presencia clínica de la enfermedad, y poder evaluar las pérdidas reproductivas que este microorganismo ocasiona.

Los resultados que obtuvimos de 2,2% de positivos a *C. fetus* por toro en la muestra son muy similares a la prevalencia estimada por Repiso et al. (2005), de 2,6% utilizando el método de cultivo y aislamiento, es decir que la prevalencia individual estimada se mantiene muy similar en nuestro país. En cuanto al porcentaje de establecimientos positivos a *C. fetus* de 10,4%, se observa una diferencia con respecto al 20,5% reportado por Repiso et al. (2005) estimado sobre la base de 47 aislamientos positivos. Por otra parte, Repiso et al. (2005) informaron que 93,7% de los productores no tiene diagnóstico ni cree tener antecedentes de CGB, lo que lleva a que tan solo el 4,7% de los productores utilicen la vacuna como medida preventiva para el control de la enfermedad.

Los protocolos de cultivo y aislamiento descritos presentan dificultades tales como su lento crecimiento, la presencia de microorganismos contaminantes (Lander, 1990a) y condiciones atmosféricas específicas como requerimiento para su crecimiento, por lo que parte de la estrategia de investigación de nuestro trabajo fue poner a punto una metodología de obtención de muestras, de transporte y procesamiento que funcione correctamente. También se debe tener en cuenta que todas las muestras provienen de ambientes muy contaminados: prepucio, vagina y fetos abortados (Tait et al. 1983), lo que dificulta aún más poder obtener el cultivo positivo y el aislamiento.

Las técnicas de diagnóstico para la detección de *C. fetus* y sus subespecies han sido motivo de mucha investigación buscando desarrollar metodologías que sean prácticas, rápidas y de bajo costo. On (1996) realizó una revisión sobre los métodos de identificación para el género *Campylobacter*, comparando pruebas bioquímicas, pruebas serológicas, PCR y otros métodos genéticos. La principal conclusión de la revisión es que, a pesar del desarrollo tecnológico, todavía existe la necesidad de poner a punto un método práctico y rentable para la identificación precisa y rápida de especies y subespecies de *Campylobacter*. A su vez, el cultivo y aislamiento ofrece muchas desventajas como herramienta de diagnóstico.

El cultivo y las pruebas bioquímicas siguen siendo las técnicas *gold standard* para el diagnóstico e identificación de *C. fetus* y sus subespecies, pero las dificultades de crecimiento y la falta de reproducibilidad de algunas pruebas bioquímicas motivaron el desarrollo de herramientas de diagnóstico molecular que sean más prácticas. La PCR comenzó a utilizarse como metodología para la correcta identificación de las especies de *Campylobacter*. En la actualidad, la PCR es principalmente utilizada para la identificación precisa de subespecie a partir de aislamientos de *C. fetus*. Pannachio et al. (1993) y Hum et al. (1997) desarrollaron una PCR con el objetivo de lograr una correcta identificación de Cfv y de Cff. Luego Abril et al. (2007) desarrollaron una múltiple PCR con la cual obtuvieron un 100% de sensibilidad y un 100% de especificidad en la identificación de especie *C. fetus* mediante la detección del gen *nahE*, aunque obtuvieron un 97% de sensibilidad para el gen diana *ISCfe1* específico de Cfv, y por lo tanto no puede utilizarse eficientemente para diferenciar entre cepas de Cff y de Cfv (Van der Graaf et al. 2013).

Las 2 muestras AD35 y AF 26 que dieron positivo a qPCR, pero no se obtuvo crecimiento en los medios de cultivo, fueron consideradas como “*falsas positivas*” para el cálculo estimado de la sensibilidad y especificidad. De todas maneras, nos parece correcto considerarlas como muestras que realmente tenían presencia de *C. fetus* detectada por qPCR, considerándolas “positivas”, dado por la información generada por Iraola et al. (2016), y también por la sensibilidad del 83,3% y especificidad de 99,3% de la qPCR. Además, dada la baja sensibilidad descrita que tiene el cultivo, entre 32,7 y 60% (Dutra 2013, García Guerra et al. 2014), nos lleva a poner en discusión que una misma muestra que fue negativa al cultivo pero positiva a qPCR, es muy probable que sea realmente positiva. Por otra parte, hay 1 muestra (AD 29) en la que se obtuvo aislamiento por cultivo, pero la qPCR dio negativa. Esta muestra la consideramos como “*falsa negativa*” a qPCR, lo que repercutió en una disminución en la estimación de la sensibilidad de la qPCR como técnica que está siendo evaluada. A su vez, el valor de concordancia *kappa* de 0,76 entre el cultivo y la qPCR establece una excelente concordancia entre los resultados de ambas técnicas, en base a las referencias establecidas por Landis y Koch (1977), quienes propusieron una escala de interpretación del valor de *kappa* que considera como “aceptable” un valor mayor o igual a 0,40 y “excelente” los valores superiores a 0,75 (Manual de Epidat 3.1).

El protocolo descrito por Iraola et al. (2016) es una técnica precisa y rápida, sensible y específica. Utilizar esta qPCR como técnica de *screening* podría generar un avance en la eficiencia para la detección de la presencia de *C. fetus* directamente en las muestras obtenidas en el campo. En el caso de que todos los toros sean negativos a qPCR, podemos concluir con una especificidad del 99% que el rodeo es libre. En el caso de que haya algún resultado positivo, se podría confirmar posteriormente por cultivo y aislamiento. Una ventaja de la PCR y las técnicas de biología molecular es que se basan en la detección del ADN y por lo tanto pueden detectar el patógeno, aunque se encuentre en muy bajas concentraciones. Además, la sensibilidad y especificidad de esta qPCR nos permiten analizar pools de muestras, lo que disminuye significativamente el tiempo de trabajo cuando se trata de un número significativo de toros, como en el caso de predios comerciales en Uruguay.

La información que aporta un análisis de laboratorio debe complementarse con toda la información clínica disponible, incluyendo la historia del rodeo, el examen objetivo general de los animales, y los signos clínicos. Es decir que debe haber alguno de los signos clínicos tales como presencia de infertilidad temporaria, repetición de celos y abortos esporádicos en las hembras para complementar un resultado positivo en un análisis de laboratorio. Para establecer un diagnóstico definitivo, muchas veces se

requiere más de un resultado de laboratorio, como lo son, los resultados de la técnica de cultivo y aislamiento y la técnica de PCR, en parte, por la complejidad que requiere *Campylobacter fetus* para su crecimiento, como así las diferentes sensibilidades y especificidades de ambas técnicas, lo que pueden llevar a falsos positivos/falsos negativos.



## 8. CONCLUSIONES

- La qPCR es una técnica que resulta adecuada para la detección de *C. fetus* directamente a partir de muestras de esmegma prepucial, ya que presenta un valor adecuado de concordancia *kappa* (0,76) con el *gold standard* por lo que puede ser utilizada como técnica de screening previo a realizar el cultivo.
- Esta técnica (qPCR) presenta la ventaja de ser más rápida y permite analizar un número mayor de animales en un tiempo menor en comparación con la técnica de cultivo y aislamiento.
- *Campylobacter fetus* sigue estando presente en nuestro país en establecimientos de diferentes seccionales departamentales.

## CONSIDERACIONES FINALES

De cara a los próximos años nos proyectamos a continuar ampliando el número de muestras obtenidas, para seguir aislando el *Campylobacter fetus* para posteriores estudios moleculares y genómicos.

Se debería continuar la investigación a nivel genómico y molecular para aproximarse a conocer si es realmente necesario que una técnica de diagnóstico pueda diferenciar entre subespecies de Cfv y Cff.

El estudio aquí desarrollado fue parte de un trabajo publicado junto con otros autores (Delpiazzo et al. 2021) en el que se buscó demostrar la utilidad de la qPCR en muestras clínicas de raspaje prepucial para el diagnóstico de *C. fetus* (Ver Anexos).

## 10. BIBLIOGRAFIA

1. Alves, TM; Stynen, APR; Miranda, KL. (2011). Campilobacteriose genital bovina e tricomonose genital bovina : epidemiologia, diagnóstico e controle 1. Pesquisa Veterinaria Brasileira 31(4): 336–344.
2. Balzan, C; Ziech RE; Gressler LT; Vargas APC. (2020). Bovine genital campylobacteriosis: main features and perspectives for diagnosis and control. Ciência Rural 50(3): e20190272.
3. Barcellos, M. (2018). Diagnóstico y caracterización genética de *Campylobacter* en materia fecal de animales domésticos y silvestres de la región. Tesis de grado. Facultad de Ciencias, Udelar, 91 p.
4. BonDurant, RH. (2005). Venereal Diseases of Cattle: Natural History, Diagnosis, and the Role of Vaccines in their Control. Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice 21(2): 383-408.
5. Boomsma, A. (2005). Confidence Intervals for a Binomial Proportion. Disponible en: <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.449.4528&rep=rep1&type=pdf> Fecha de consulta: 3/5/21.
6. Bove, R; López, F; Perera, C; Carracelas, B; Torres-Dini, D; De Souza, G; Azambuja, C; Bermúdez, J; Alzugaray, F; Mederos A. (2013). Diagnóstico de *Campylobacter fetus* venerealis por PCR, en un aborto bovino espontáneo. Veterinaria (Montevideo) 49(189-192):17-23.
7. Bryner, JH; O´Berry PA; Frank AH. (1964). Vibrio infection of the digestive organs of cattle. American Journal of Veterinary Research 25:1048–1050.
8. Calleros, L. (2015). Análisis de la variabilidad genética en *Campylobacter fetus*. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencia, Udelar, 200 p.
9. Campero, CM; Moore, DP; Odeón, AC; Cipolla, AL; Odriozola, E. (2003). Aetiology of Bovine Abortion in Argentina. Veterinary Research Communications 27(5): 359-369.
10. Clark, BL. (1971). Review of Bovine Vibriosis. Australian Veterinary Journal 47(3):103-107.
11. Clark, BL; Dufty, JH. (1978). Isolation of *Campylobacter fetus* from bulls. Australian Veterinary Journal 54(5):262–263.
12. Cobo, ER; Cipolla, A; Morsella, C; Cano, D; Campero, C. (2003). Effect of two commercial vaccines to *Campylobacter fetus* subspecies on heifers naturally challenged. Journal of Veterinary Medicine B. Infectious Diseases and Veterinary Public Health 50(2): 75–80.

13. Corbeil, LB. (1999). Immunization and diagnosis in bovine reproductive tract infections. *Advances in Veterinary Medicine* 41: 217-239.
14. Delpiazzo, R. (2018). Aislamiento e identificación de *Campylobacter fetus* y *Tritrichomona foetus* en toros del Uruguay. Tesis de maestría. Facultad de Veterinaria, Udelar, 42 p.
15. Delpiazzo, R; Barcellos, M; Barros, S; Betancor, L; Fraga, M; Gil, J; Iraola, G; Morsella, C; Paolicchi, F; Pérez, R; Riet-Correa, F; Sanguinetti, M; Silva, A; da Silva Silveira, C; Calleros, L. (2021). Accurate and fast identification of *Campylobacter fetus* in bulls by real-time PCR targeting a 16S rRNA gene sequence. *Veterinary and Animal Science* 11: 100163.
16. Dingle, KE; Blaser, MJ; Tu, Z-C; Pruckler, J; Fitzgerald, C; van Bergen, MAP; Lawson, AJ; Owen, RJ; Wagenaar, JA. (2010). Genetic relationships among reptilian and mammalian *Campylobacter fetus* strains determined by multilocus sequence typing. *Journal of Clinical Microbiology* 48(3): 977–980.
17. Easton, C. (2006). Estudio patológico de las principales causas infecciosas en el aborto bovino en Uruguay. Tesis de Maestría. Facultad de Veterinaria, Udelar, 60 p.
18. Eppinger, M; Baar, C; Raddatz, G; Huson, DH; Schuster, SC. (2004). Comparative analysis of four *Campylobacter*ales. *Nature Reviews Microbiology* 2(11): 872–885.
19. Fitzgerald, C; Tu, ZC; Patrick, M; Stiles, T; Lawson, AJ; Santovenia, M; Gilbert, MJ; van Bergen, M; Joyce, K; Pruckler, J; Stroika, S; Duim, B; Miller, WG; Loparev, VL; Sinnige, JC; Fields, PI; Tauxe, RV; Blaser, MJ; Wagenaar, JA. (2014). Description of *Campylobacter fetus* subsp. *testudinum* subsp. nov., isolated from humans and reptiles. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64(9): 2944-2948.
20. George, HA; Hoffman, PS; Smibert, RM; Krieg, NR. (1978). Improved media for growth and aerotolerance of *Campylobacter fetus*. *Journal of Clinical Microbiology* 8(1): 36–41.
21. Gupta, RS. (2006). Molecular signatures (unique proteins and conserved indels) that are specific for the epsilon proteobacteria (*Campylobacter*ales). *BMC Genomics* 7: 167.
22. Iraola, G; Pérez, R; Betancor, L; Marandino, A; Morsella, C; Méndez, A; Paolicchi, F; Piccirillo, A; Tomás, G; Velilla, A; Calleros, L. (2016). A novel real-time PCR assay for quantitative detection of *Campylobacter fetus* based on ribosomal sequences. *BMC Veterinary Research* 12: 286.
23. ITC Trade Map, 2020 ITC.
24. Jeffrey, M; Hogg, RA. (1988). Concurrent bovine virus diarrhoea virus and *Campylobacter fetus* infection in an aborted bovine fetus. *Veterinary Record* 122(4): 89-90.

25. Kiggins, EM; Plastridge, WN. (1958). Some metabolic activities of *Vibrio fetus* of bovine origin. *Journal of Bacteriology* 75(2): 205–208.
26. Linton, D; Owen, RJ; Stanley, J. (1996). Rapid identification by PCR of the genus *Campylobacter* and of five *Campylobacter* species enteropathogenic for man and animals. *Research in Microbiology*. 147(9): 707–718.
27. LPSN Bacterio.net (List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature) (2018). Disponible en: <http://www.bacterio.net/campylobacter.html> Fecha de consulta: 19 de febrero de 2019.
28. Manual de Epidat 3.1. (2005). Análisis epidemiológico de datos tabulados. Santiago de Compostela: Xunta de Galicia.
29. McMillen, L; Fordyce, G; Doogan VJ; Lew, AE. (2006). Comparison of Culture and a Novel 5´ Taq Nuclease Assay for Direct Detection of *Campylobacter fetus* subsp. *Venerealis* in Clinical Specimens from Cattle. *Journal of Clinical Microbiology* 44(3): 938-945.
30. MGAP-DIEA (2019) Anuario Estadístico Agropecuario. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/unidad-organizativa/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/publicaciones/anuarios-diea/anuario-estadístico-de-diea-2019> Fecha de consulta: 20 de octubre de 2020.
31. Molina, L; Perea, J; Meglia, G; Angón, E; García, A. (2013). Spatial and temporal epidemiology of bovine trichomoniasis and bovine genital campylobacteriosis in La Pampa province (Argentina). *Preventive Veterinary Medicine* 110(3-4): 388–394.
32. Mshelia, GD; Amin, JD; Woldehiwet, Z; Murray, RD; Egwu, GO. (2010). Epidemiology of bovine venereal campylobacteriosis: geographic distribution and recent advances in molecular diagnostic techniques. *Reproduction in Domestic Animals* 45(5): 221-230.
33. NCBI Taxonomy Browser. (2021). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=72294&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock> Fecha de consulta: 21 de febrero de 2021.
34. Newsam, DB. (1960). Experimental vibrio fetus infection in heifers. Part 1: Infection and conception rates, and diagnosis. *Australian Veterinary Journal* 36(11): 426-431.
35. Newsam, DB; Peterson, JE. (1964). Persistence of vibrio fetus in genital tract of experimentally infected heifers. *British Veterinary Journal* 120(5): 223-228.
36. OIE (2018). Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres. Campilobacteriosis genital bovina. Disponible en: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/3.04.04\\_Campilobact\\_bovina.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.04.04_Campilobact_bovina.pdf) Fecha de consulta: 3 de mayo de 2021.

37. On SL. (1996). Identification Methods for Campylobacters, Helicobacters, and Related Organisms. *Clinical Microbiology Reviews* 9: 405-422.
38. On SL; Harrington CS. (2001). Evaluation of numerical analysis of PFGE-DNA profiles for differentiating *Campylobacter fetus* subspecies by comparison with phenotypic, PCR and 16s rDNA sequencing methods. *Journal of Applied Microbiology* 90: 285–293.
39. Patrick, ME; Gilbert, MJ; Blaser, MJ; Tauxe, RV; Wagenaar, JA; Fitzgerald, C. (2013). Human Infections with New Subspecies of *Campylobacter fetus*. *Emerging Infectious Diseases* 19(10): 1678–1680.
40. Penner, JL. (1988). The Genus *Campylobacter*: a Decade of Progress. *Clinical Microbiology Reviews* 1(2):157-172.
41. Peterson, JE; Newsam, DB. (1964). The histopathology of genital vibriosis in virgin heifers. *British Veterinary Journal* 120(5): 229-245.
42. Samuelson, JD; Winter, AJ. (1966). Bovine vibriosis: the nature of the carrier state in the bull. *Journal of Infectious Diseases* 116(5): 581-592.
43. Schunck, B; Kraft, W; Truyen, U. (1995). A simple touch-down polymerase chain reaction for the detection of canine parvovirus and feline panleukopenia virus in feces. *Journal of Virological Methods* 55(3): 427-433.
44. Schurig, G; Hall, CE; Burda, K; Corbeil, LB; Duncan, JR; Winter, AJ. (1974). Infection patterns in heifers following cervicovaginal or intrauterine instillation of *Campylobacter (Vibrio) fetus venerealis*. *Cornell Veterinarian* 64(4): 533-548.
45. Selim, AM; Elhaig, MM; Gaede, W. 2014. Development of multiplex real-time PCR assay for the detection of *Brucella* spp., *Leptospira* spp. and *Campylobacter foetus*. *Veterinaria Italiana* 50(4): 269–75.
46. Silveira, CS; Fraga, M; Giannitti, F; Macías-Rioseco, M; Riet-Correa, F. (2018). Diagnosis of Bovine Genital *Campylobacteriosis* in South America. *Frontiers in Veterinary Science*, 5: 321.
47. Tedesco, LF; Errico, F; Del Baglivi, LP. (1977). Comparison of three sampling methods for the diagnosis of genital vibriosis in the bull. *Australian Veterinary Journal* 53: 470–472.
48. Terzolo, HR; Campero, C; Catena, M. (1992). Procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la *Campylobacteriosis* y *Trichomoniasis* Genital Bovina. Buenos Aires: INTA, 33 p.
49. Thrusfield M. (1995). Observational studies. En Thrusfield M. *Veterinary Epidemiology*. 2ª ed. Cambridge: Blackwell Science; p. 266-285.

50. Veron, M; Chatelain, R. (1973). Taxonomic Study of the Genus *Campylobacter* Sebald and Veron and Designation of the Neotype Strain for the Type Species, *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Veron. *International Journal of Systematic Bacteriology* 23(2): 122–134.
51. Wilson EB. (1927). Probable inference, the law of succession, and statistical inference. *Journal of the American Statistical Association* 22: 209–212.

## 10. ANEXOS

- a) Artículo publicado “Accurate and fast identification of *Campylobacter fetus* in bulls by real-time PCR targeting a 16S rRNA gene sequence”.

Enlace: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2451943X20300764>

- b) Tabla de registro de muestras individuales:

N°	Muestra	Departamento	n° Establecimiento	Fecha	Cultivo <i>Campylobacter fetus</i>	rt PCR <i>Campylobacter fetus</i>
1	AD 1	San José	1	07-nov-18	Negativo	Negativo
2	AD 2	Rivera	2	07-nov-18	Negativo	Negativo
3	AD 3	Rivera	2	07-nov-18	Negativo	Negativo
4	AD 4	Rivera	2	07-nov-18	Negativo	Negativo
5	AD 5	Rivera	2	07-nov-18	Negativo	Negativo
6	AD 6	Rivera	2	07-nov-18	Negativo	Negativo
7	AD 7	Rivera	2	07-nov-18	Negativo	Negativo
8	AD 8	Rivera	2	07-nov-18	Negativo	Negativo
9	AD 9	Rivera	2	07-nov-18	Negativo	Negativo
10	AD 10	Rivera	2	07-nov-18	Negativo	Negativo
11	AD 11	Rivera	2	07-nov-18	Negativo	Negativo
12	AD 12	Rivera	2	07-nov-18	Negativo	Negativo
13	AD 13	Rivera	2	07-nov-18	Negativo	Negativo
14	AD 14	Rivera	2	07-nov-18	Negativo	Negativo
15	AD 15	Rivera	2	07-nov-18	Negativo	Negativo
16	AD 16	Rivera	2	07-nov-18	Negativo	Negativo
17	AD 17	Rivera	2	07-nov-18	Negativo	Negativo
18	AD 18	Rivera	2	07-nov-18	Negativo	Negativo

19	AD 19	Rivera	2	07-nov-18	Negativo	Negativo
20	AD 20	San José	3	07-nov-18	Negativo	Negativo
21	AD 21	San José	3	07-nov-18	Negativo	Negativo
22	AD 22	San José	4	07-nov-18	Negativo	Negativo
23	AD 23	Canelones	5	07-nov-18	Negativo	Negativo
24	AD 24	Canelones	5	07-nov-18	Negativo	Negativo
25	AD 25	Canelones	5	07-nov-18	Negativo	Negativo
26	AD 26	Canelones	5	07-nov-18	Negativo	Negativo
27	AD 27	Canelones	5	07-nov-18	Negativo	Negativo
28	AD 28	Canelones	5	07-nov-18	Negativo	Negativo
29	AD 29	Canelones	5	07-nov-18	<b>POSITIVO</b>	Negativo
30	AD 30	Canelones	5	07-nov-18	Negativo	Negativo
31	AD 31	Artigas	6	07-nov-18	Negativo	Negativo
32	AD 32	Artigas	6	07-nov-18	Negativo	Negativo
33	AD 33	Artigas	6	07-nov-18	Negativo	Negativo
34	AD 34	Artigas	6	07-nov-18	Negativo	Negativo
35	AD 35	Artigas	6	07-nov-18	Negativo	<b>POSITIVO</b>
36	AD 36	Artigas	6	07-nov-18	Negativo	Negativo
37	AD 37	Artigas	6	07-nov-18	Negativo	Negativo
38	AD 38	Artigas	6	07-nov-18	Negativo	Negativo
39	AD 39	Salto	7	07-nov-18	Negativo	Negativo
40	AD 40	Artigas	8	07-nov-18	Negativo	Negativo
41	AD 41	Artigas	8	07-nov-18	Negativo	Negativo
42	AD 42	Artigas	8	07-nov-18	Negativo	Negativo
43	AD 43	Artigas	8	07-nov-18	Negativo	Negativo



44	AD 44	Artigas	8	07-nov-18	Negativo	Negativo
45	AE 1	Salto	9	05-dic-18	Negativo	Negativo
46	AE 2	Salto	9	05-dic-18	Negativo	Negativo
47	AE 3	Salto	9	05-dic-18	Negativo	Negativo
48	AE 4	Salto	9	05-dic-18	Negativo	Negativo
49	AE 5	Salto	9	05-dic-18	Negativo	Negativo
50	AE 6	Salto	10	05-dic-18	Negativo	Negativo
51	AE 7	Salto	11	05-dic-18	Negativo	Negativo
52	AE 8	Salto	11	05-dic-18	Negativo	Negativo
53	AE 9	Salto	11	05-dic-18	<b>positivo</b>	<b>positivo</b>
54	AE 10	Salto	11	05-dic-18	Negativo	Negativo
55	AE 11	Salto	12	05-dic-18	Negativo	Negativo
56	AE 12	Salto	12	05-dic-18	Negativo	Negativo
57	AE 13	Salto	12	05-dic-18	Negativo	Negativo
58	AE 14	Salto	12	05-dic-18	<b>positivo</b>	<b>positivo</b>
59	AE 15	Salto	13	05-dic-18	Negativo	Negativo
60	AE 16	Salto	13	05-dic-18	<b>positivo</b>	<b>positivo</b>
61	AE 17	Salto	13	05-dic-18	Negativo	Negativo
62	AE 18	Salto	13	05-dic-18	Negativo	Negativo
63	AE 19	San José	14	05-dic-18	Negativo	Negativo
64	AE 20	San José	14	05-dic-18	Negativo	Negativo
65	AE 21	San José	15	05-dic-18	Negativo	Negativo
66	AE 22	San José	15	05-dic-18	Negativo	Negativo
67	AE 23	San José	15	05-dic-18	Negativo	Negativo
68	AE 24	San José	15	05-dic-18	Negativo	Negativo

69	AE 25	San José	15	05-dic-18	Negativo	Negativo
70	AE 26	San José	15	05-dic-18	Negativo	Negativo
71	AE 27	San José	15	05-dic-18	Negativo	Negativo
72	AE 28	San José	15	05-dic-18	Negativo	Negativo
73	AE 29	Salto	16	05-dic-18	Negativo	Negativo
74	AE 30	Salto	16	05-dic-18	Negativo	Negativo
75	AE 31	Salto	16	05-dic-18	Negativo	Negativo
76	AE 32	Salto	17	05-dic-18	Negativo	Negativo
77	AE 33	Salto	17	05-dic-18	Negativo	Negativo
78	AE 34	Salto	17	05-dic-18	Negativo	Negativo
79	AE 35	Salto	17	05-dic-18	Negativo	Negativo
80	AE 36	Salto	17	05-dic-18	Negativo	Negativo
81	AE 37	Salto	17	05-dic-18	Negativo	Negativo
82	AE 38	Salto	17	05-dic-18	Negativo	Negativo
83	AE 39	Salto	17	05-dic-18	Negativo	Negativo
84	AE 40	Salto	17	05-dic-18	Negativo	Negativo
85	AE 41	Salto	17	05-dic-18	Negativo	Negativo
86	AE 42	Salto	17	05-dic-18	Negativo	Negativo
87	AE 43	Salto	17	05-dic-18	Negativo	Negativo
88	AE 44	Salto	17	05-dic-18	Negativo	Negativo
89	AF 1	Florida	18	13-feb-19	Negativo	Negativo
90	AF 2	Cerro Largo	19	13-feb-19	Negativo	Negativo
91	AF 3	Cerro Largo	19	13-feb-19	Negativo	Negativo
92	AF 4	Cerro Largo	19	13-feb-19	Negativo	Negativo
93	AF 5	Cerro Largo	19	13-feb-19	Negativo	Negativo

94	AF 6	Cerro Largo	19	13-feb-19	Negativo	Negativo
95	AF 7	Cerro Largo	19	13-feb-19	Negativo	Negativo
96	AF 8	Cerro Largo	19	13-feb-19	Negativo	Negativo
97	AF 9	Cerro Largo	19	13-feb-19	Negativo	Negativo
98	AF 10	Cerro Largo	19	13-feb-19	Negativo	Negativo
99	AF 11	Cerro Largo	19	13-feb-19	Negativo	Negativo
100	AF 12	Cerro Largo	19	13-feb-19	Negativo	Negativo
101	AF 13	Cerro Largo	19	13-feb-19	Negativo	Negativo
102	AF 14	Cerro Largo	19	13-feb-19	Negativo	Negativo
103	AF 15	Cerro Largo	19	13-feb-19	Negativo	Negativo
104	AF 16	Cerro Largo	19	13-feb-19	Negativo	Negativo
105	AF 17	Cerro Largo	19	13-feb-19	Negativo	Negativo
106	AF 18	Cerro Largo	19	13-feb-19	Negativo	Negativo
107	AF 19	Cerro Largo	19	13-feb-19	Negativo	Negativo
108	AF 20	Cerro Largo	19	13-feb-19	Negativo	Negativo
109	AF 21	Cerro Largo	19	13-feb-19	Negativo	Negativo
110	AF 22	Cerro Largo	19	13-feb-19	Negativo	Negativo
111	AF 23	Cerro Largo	19	13-feb-19	Negativo	Negativo
112	AF 24	Cerro Largo	19	13-feb-19	Negativo	Negativo
113	AF 25	Cerro Largo	19	13-feb-19	Negativo	Negativo
114	AF 26	Cerro Largo	19	13-feb-19	Negativo	Positivo
115	AF 27	Cerro Largo	20	13-feb-19	Negativo	Negativo
116	AF 28	Cerro Largo	20	13-feb-19	Negativo	Negativo
117	AF 29	Cerro Largo	20	13-feb-19	Negativo	Negativo
118	AF 30	Cerro Largo	20	13-feb-19	Negativo	Negativo

119	AF 31	Cerro Largo	20	13-feb-19	Negativo	Negativo
120	AF 32	Cerro Largo	20	13-feb-19	Negativo	Negativo
121	AF 33	Cerro Largo	20	13-feb-19	Negativo	Negativo
122	AF 34	Cerro Largo	20	13-feb-19	Negativo	Negativo
123	AF 35	Cerro Largo	20	13-feb-19	Negativo	Negativo
124	AF 36	Cerro Largo	20	13-feb-19	Negativo	Negativo
125	AF 37	Cerro Largo	20	13-feb-19	Negativo	Negativo
126	AF 38	Cerro Largo	20	13-feb-19	Negativo	Negativo
127	AF 39	Cerro Largo	20	13-feb-19	Negativo	Negativo
128	AF 40	Cerro Largo	20	13-feb-19	Negativo	Negativo
129	AF 41	Cerro Largo	20	13-feb-19	Negativo	Negativo
130	AF 42	Cerro Largo	20	13-feb-19	Negativo	Negativo
131	AF 43	Cerro Largo	20	13-feb-19	Negativo	Negativo
132	AF 44	Salto	21	13-feb-19	Negativo	Negativo
133	AF 45	Salto	21	13-feb-19	Negativo	Negativo
134	AF 46	Salto	21	13-feb-19	Negativo	Negativo
135	AF 47	Salto	21	13-feb-19	positivo	Positivo
136	AF 48	Salto	21	13-feb-19	Negativo	Negativo
137	AF 49	Salto	21	13-feb-19	Negativo	Negativo
138	AF 50	Salto	21	13-feb-19	Negativo	Negativo
139	AF 51	Salto	21	13-feb-19	Negativo	Negativo
140	AF 52	Salto	21	13-feb-19	Negativo	Negativo
141	AF 53	Salto	21	13-feb-19	positivo	positivo
142	AF 54	Salto	21	13-feb-19	Negativo	Negativo
143	AF 55	Salto	21	13-feb-19	Negativo	Negativo

144	AF 56	Salto	21	13-feb-19	Negativo	Negativo
145	AF 57	Salto	21	13-feb-19	Negativo	Negativo
146	AG 1	Lavalleja	22	20-feb-19	Negativo	Negativo
147	AG 2	Salto	23	20-feb-19	Negativo	Negativo
148	AG 3	Salto	23	20-feb-19	Negativo	Negativo
149	AG 4	Salto	23	20-feb-19	Negativo	Negativo
150	AG 5	Salto	23	20-feb-19	Negativo	Negativo
151	AG 6	Salto	23	20-feb-19	Negativo	Negativo
152	AG 7	Salto	23	20-feb-19	Negativo	Negativo
153	AG 8	Salto	23	20-feb-19	Negativo	Negativo
154	AG 9	Salto	23	20-feb-19	Negativo	Negativo
155	AG 10	Salto	24	20-feb-19	Negativo	Negativo
156	AG 11	Salto	24	20-feb-19	Negativo	Negativo
157	AG 12	Salto	24	20-feb-19	Negativo	Negativo
158	AG 13	Salto	25	20-feb-19	Negativo	Negativo
159	AG 14	Salto	25	20-feb-19	Negativo	Negativo
160	AG 15	Colonia	26	20-feb-19	Negativo	Negativo
161	AG 16	Florida	27	20-feb-19	Negativo	Negativo
162	AG 17	Florida	28	20-feb-19	Negativo	Negativo
163	AG 18	Florida	28	20-feb-19	Negativo	Negativo
164	AG 19	Durazno	29	20-feb-19	Negativo	Negativo
165	AG 20	Durazno	29	20-feb-19	Negativo	Negativo
166	AG 21	Durazno	29	20-feb-19	Negativo	Negativo
167	AG 22	Florida	30	20-feb-19	Negativo	Negativo
168	AG 23	Florida	31	20-feb-19	Negativo	Negativo

169	AG 24	Florida	32	20-feb-19	Negativo	Negativo
170	AG 25	Florida	33	20-feb-19	Negativo	Negativo
171	AG 26	Canelones	34	20-feb-19	Negativo	Negativo
172	AG 27	Canelones	34	20-feb-19	Negativo	Negativo
173	AG 28	Canelones	34	20-feb-19	Negativo	Negativo
174	AG 29	Canelones	34	20-feb-19	Negativo	Negativo
175	AG 30	Canelones	34	20-feb-19	Negativo	Negativo
176	AG 31	Canelones	34	20-feb-19	Negativo	Negativo
177	AG 32	Canelones	34	20-feb-19	Negativo	Negativo
178	AG 33	Canelones	34	20-feb-19	Negativo	Negativo
179	AH1	Cerro Largo		03-jul-19	Negativo	Negativo
180	AH2	Cerro Largo		03-jul-19	Negativo	Negativo
181	AH3	Cerro Largo		03-jul-19	Negativo	Negativo
182	AH4	Cerro Largo		03-jul-19	Negativo	Negativo
183	AH5	Cerro Largo		03-jul-19	Negativo	Negativo
184	AH6	Cerro Largo		03-jul-19	Negativo	Negativo
185	AH7	Cerro Largo		03-jul-19	Negativo	Negativo
186	AH8	Cerro Largo		03-jul-19	Negativo	Negativo
187	AH9	Cerro Largo		03-jul-19	Negativo	Negativo
188	AH10	Cerro Largo		03-jul-19	Negativo	Negativo
189	AH11	Cerro Largo		03-jul-19	Negativo	Negativo
190	AH12	Cerro Largo		03-jul-19	Negativo	Negativo
191	AH13	Cerro Largo		03-jul-19	Negativo	Negativo
192	AH14	Cerro Largo		03-jul-19	Negativo	Negativo

193	AH15	Cerro Largo		03-jul-19	Negativo	Negativo
194	AH16	Cerro Largo		03-jul-19	Negativo	Negativo
195	AH17	Cerro Largo		03-jul-19	Negativo	Negativo
196	AH18	Cerro Largo		03-jul-19	Negativo	Negativo
197	AH19	Colonia		03-jul-19	Negativo	Negativo
198	AH20	Colonia		03-jul-19	Negativo	Negativo
199	AH21	Colonia		03-jul-19	Negativo	Negativo
200	AH22	Colonia		03-jul-19	Negativo	Negativo
201	AH23	Colonia		03-jul-19	Negativo	Negativo
202	AH24	Colonia		03-jul-19	Negativo	Negativo
203	AH25	Colonia		03-jul-19	Negativo	Negativo
204	AH26	Cerro Largo		03-jul-19	Negativo	Negativo
205	AH27	Colonia		03-jul-19	Negativo	Negativo
206	AH28	Colonia		03-jul-19	Negativo	Negativo
207	AH29	Artigas		03-jul-19	Negativo	Negativo
208	AH30	San José		03-jul-19	Negativo	Negativo
209	AH31	San José		03-jul-19	Negativo	Negativo
210	AH32	San José		03-jul-19	Negativo	Negativo
211	AH33	San José		03-jul-19	Negativo	Negativo
212	AH34	San José		03-jul-19	Negativo	Negativo
213	AH35	San José		03-jul-19	Negativo	Negativo
214	AH36	San José		03-jul-19	Negativo	Negativo
215	AH37	San José		03-jul-19	Negativo	Negativo

216	AH38	San José		03-jul-19	Negativo	Negativo
217	AH39	San José		03-jul-19	Negativo	Negativo
218	AH40	San José		03-jul-19	Negativo	Negativo
219	AH41	San José		03-jul-19	Negativo	Negativo
220	AH42	San José		03-jul-19	Negativo	Negativo
221	AH43	San José		03-jul-19	Negativo	Negativo
222	AH44	San José		03-jul-19	Negativo	Negativo
223	AH45	San José		03-jul-19	Negativo	Negativo
224	AH46	Cerro Largo		03-jul-19	Negativo	Negativo
225	AI1	Cerro Largo		10-jul-19	Negativo	Negativo
226	AI2	Cerro Largo		10-jul-19	Negativo	Negativo
227	AI3	Cerro Largo		10-jul-19	Negativo	Negativo
228	AI4	Cerro Largo		10-jul-19	Negativo	Negativo
229	AI5	Cerro Largo		10-jul-19	Negativo	Negativo
230	AI6	Cerro Largo		10-jul-19	Negativo	Negativo
231	AI7	Cerro Largo		10-jul-19	Negativo	Negativo
232	AI8	San José		10-jul-19	Negativo	Negativo
233	AI9	San José		10-jul-19	Negativo	Negativo
234	AI10	Salto		10-jul-19	Negativo	Negativo
235	AI11	Salto		10-jul-19	Negativo	Negativo
236	AI12	Salto		10-jul-19	Negativo	Negativo
237	AI13	Salto		10-jul-19	Negativo	Negativo
238	AI14	Salto		10-jul-19	Negativo	Negativo



239	AI15				Negativo	Negativo
240	AI16	Artigas		10-jul-19	Negativo	Negativo
241	AI17	Salto		10-jul-19	Negativo	Negativo
242	AI18	Salto		10-jul-19	Negativo	Negativo
243	AI19	Salto		10-jul-19	Negativo	Negativo
244	AI20	Salto		10-jul-19	Negativo	Negativo
245	AI21	Salto		10-jul-19	Negativo	Negativo
246	AI22	Salto		10-jul-19	Negativo	Negativo
247	AI23	Salto		10-jul-19	Negativo	Negativo
248	AI24	Salto		10-jul-19	Negativo	Negativo
249	AI25	Salto		10-jul-19	Negativo	Negativo
250	AI26	Salto		10-jul-19	Negativo	Negativo
251	AI27	Salto		10-jul-19	Negativo	Negativo
252	AI28	Salto		10-jul-19	Negativo	Negativo
253	AI29	Salto		10-jul-19	Negativo	Negativo
254	AI30	Salto		10-jul-19	Negativo	Negativo
255	AI31	Salto		10-jul-19	Negativo	Negativo
256	AI32	Salto		10-jul-19	Negativo	Negativo
257	AI33	Salto		10-jul-19	Negativo	Negativo
258	AI34	Salto		10-jul-19	Negativo	Negativo
259	AI35	Salto		10-jul-19	Negativo	Negativo
260	AI36	Salto		10-jul-19	Negativo	Negativo
261	AI37	Salto		10-jul-19	Negativo	Negativo

262	AI38	Salto		10-jul-19	Negativo	Negativo
263	AI39	Salto		10-jul-19	Negativo	Negativo
264	AI40	Salto		10-jul-19	Negativo	Negativo
265	AI41	Salto		10-jul-19	Negativo	Negativo
266	AI42	Salto		10-jul-19	Negativo	Negativo
267	AI43	Salto		10-jul-19	Negativo	Negativo
268	AI44	Salto		10-jul-19	Negativo	Negativo
269	AI45	Salto		10-jul-19	Negativo	Negativo
270	AI46	Salto		10-jul-19	Negativo	Negativo
271	AI47	Salto		10-jul-19	Negativo	Negativo
272	AI48	Salto		10-jul-19	Negativo	Negativo
273	AI49	Salto		10-jul-19	Negativo	Negativo
274	AI50	Salto		10-jul-19	Negativo	Negativo
275	AI51	Salto		10-jul-19	Negativo	Negativo
276	AI52	Salto		10-jul-19	Negativo	Negativo
277	AI53	Salto		10-jul-19	Negativo	Negativo