



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *CAMPYLOBACTER FETUS*
Y *TRITRICHOMONA FOETUS* EN BOVINOS DEL URUGUAY**

RAFAEL ENRIQUE DELPIAZZO ANTÓN

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

URUGUAY

2018



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

***AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *CAMPYLOBACTER FETUS*
Y *TRITRICHOMONA FOETUS* EN BOVINOS DEL URUGUAY***

RAFAEL ENRIQUE DELPIAZZO ANTÓN

Dr. Franklin Riet-Correa
Director de Tesis

Dr. Jorge GIL
Co-Director

Dr. Hugo Naya
Co-Director

2018

(Esta hoja se completará una vez se defienda la Tesis y se apruebe)
**INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE
DEFENSA DE TESIS**

2018



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS
DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE
CAMPYLOBACTER FETUS* Y *TRITRICHOMONA FOETUS
EN BOVINOS DEL URUGUAY

Por: Dr. Rafael Enrique DELPIAZZO ANTÓN

Director de Tesis: Dr. Franklin Riet-Correa

Codirector de Tesis: Dr. Jorge Gil

Tribunal

Presidente: Dr. Andrés Gil

Segundo Miembro: Dr. Gustavo Gastal

Tercer Miembro: Dr. Martín Fraga

Salón Producción Animal
Viernes 7 de diciembre de 2018

APROBADA

El Fallo de aprobación de la Tesis puede ser: Aprobada (corresponde a la nota BBB- en el Acta), o Aprobada con Mención (corresponde a la nota SSS- 12 en el Acta)

INFORME DEL TRIBUNAL

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis tutores, Dr. Franklin Riet-Correa y al Dr. Jorge Gil por la buena disposición, dedicación y apoyo.

Agradecer a la Lic. Lucía Calleros y Lic. Maila Barcellos de Facultad de Ciencias por la enorme dedicación y apoyo constante en las tareas de laboratorio. También a los integrantes de la Plataforma de Salud Animal del INIA y a la Dra. Caroline Silvera por colaborar activamente. Al Dr. Fernando Paolicchi del INTA Balcarce por animarme a seguir adelante.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por darme la oportunidad, a través de la Beca de Posgrados Nacionales, de poder cursar y obtener la Maestría en mi país.

Agradecer a los Dres. Juan Franco, Oscar Feed y Rodolfo Rivero, quienes me brindaron su apoyo en los momentos críticos, para que pudiera terminar el trabajo.

Agradecer al Pocholo Bermúdez por siempre alentarme y orientarme en un tema que se presentó difícil.

A todo el personal del Frigorífico Schneck, Dr. Robert Uhlig y el equipo del Laboratorio por la excelente disposición a colaborar en todo lo que pudieran durante los muestreos. También al personal del Matadero Los Olivos, al Ing. Carlos Ortíz y a Daniel Peculio por la buena disposición.

A todos los colegas que amablemente se ofrecieron a colaborar y ser el nexo con los predios seleccionados.

A mis compañeros docentes del Departamento de Salud en los Sistemas Pecuarios de la Facultad de Veterinaria, por el apoyo que me brindaron para la realización de este trabajo.

Quiero agradecer especialmente a mis padres por todo lo que me enseñaron y transmitieron con su ejemplo.

Agradecer a mi familia y hermanos, por el ánimo y apoyo que me dieron siempre.

Por último, quiero agradecer a Dios, en quién tengo profunda fe, por tantas cosas recibidas.

INDICE

RESUMEN.....	iii
SUMMARY	iv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 CAMPILOBACTERIOSIS GENITAL BOVINA	1
1.1.1 Etiología	1
1.1.2 Transmisión.....	1
1.1.3 Patogenia en vacas	2
1.1.4 Patogenia en toros	2
1.1.5 Signos clínicos.....	3
1.1.6 Diagnóstico.....	4
1.1.6.1. Obtención de muestras	4
1.1.6.2. Técnicas de diagnóstico.....	6
1.1.7 Tratamiento	12
1.1.8 Control y prevención.....	13
1.2 TRICOMONIASIS GENITAL BOVINA.....	15
2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.....	17
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
4. HIPÓTESIS.....	20
5. OBJETIVOS	20
6. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN	21
6.1 Puesta a punto de la metodología.....	21
6.2 Muestreo de toros	21
7. MATERIALES Y MÉTODOS	22
7.1 Muestras de esmegma prepucial de toros.....	22
7.2 Procesamiento de las muestras para <i>Campylobacter fetus</i>	23
7.3 Procesamiento y cultivo de las muestras para <i>Tritrichomona foetus</i>	23
7.4 Análisis estadístico.....	24
8. RESULTADOS.....	25
9. DISCUSIÓN	29
10. CONCLUSIONES	33
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue detectar la presencia de *Campylobacter fetus* y *Tritrichomona foetus* en muestras de esmegma prepucial de toros, y poder calcular la prevalencia estimada de estos agentes. También se realizó la comparación entre la rtPCR y el cultivo y aislamiento (*gold standard*), realizando las dos técnicas a partir de la misma muestra de esmegma prepucial, para poder estimar la sensibilidad y especificidad de la rtPCR. Se realizaron 12 muestreos en los cuales se obtuvieron 315 muestras de esmegma prepucial de toros de descarte enviados a planta de faena y de predios con sospecha de la enfermedad. Todas las muestras se procesaron y analizaron siguiendo el mismo protocolo. Se sembraron en medio de cultivo Skirrow y se realizó la rtPCR en el Laboratorio de Genética de Microorganismos de la Sección Genética Evolutiva de Facultad de Ciencias dentro de las 24 horas de obtenidas en todos los casos. También se sembró 1 ml de la misma muestra en medio de cultivo Diamond TYM para *Tritrichomona foetus* en el Laboratorio de la Plataforma de Salud Animal de INIA La Estanzuela, dentro de las 24 horas de obtenidas. La sensibilidad estimada de la rtPCR fue del 100% (entre 92,9% y 100%) y la especificidad del 99,4% (entre 98,3% y 100%), con un intervalo de confianza del 95%. Se obtuvieron 7 aislamientos de *C. fetus*; 6 se identificaron como *C. fetus venerealis*, y 1 como *C. fetus fetus*. La prevalencia por toro de *C. fetus* estimada fue de 2,2% por cultivo y aislamiento, y de 2,9% por rtPCR. La prevalencia por establecimiento de *C. fetus* estimada fue de 9,7% por cultivo y aislamiento, y de 12,9% por rtPCR, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los resultados, con un intervalo de confianza del 95%. No se encontró presencia de *Tritrichomona foetus* en ninguno de los cultivos realizados. En conclusión, se estima que *C. fetus* sigue estando presente en nuestro país, en establecimientos de diferentes regiones. Además, la rtPCR utilizada es una técnica adecuada para la detección de *C. fetus* directamente a partir de muestras de esmegma prepucial como técnica de screening.

SUMMARY

The aim of this work was to detect the presence of *Campylobacter fetus* and *Tritrichomona fetus* in samples of preputial smegma of bulls, and to calculate the estimated prevalence of these agents. In addition, comparison was made between rtPCR used and the culture and isolation (*gold standard*), performing the two techniques from the same sample of preputial smegma, to estimate the sensitivity and specificity of the rtPCR. There were made 12 samplings in which 315 preputial smegma samples were obtained from discarded bulls sent to the slaughterhouse and from farms with suspected disease. These samples were processed and analyzed following the same protocol. They were cultured in Skirrow culture medium and the rtPCR was performed in the Laboratory of Genetics of Microorganisms of the Evolutionary Genetic Section of the Faculty of Sciences within 24 hours of the obtained in all cases. One ml of the same sample was also cultured in Diamond TYM culture medium for *Tritrichomona fetus* at INIA La Estanzuela Animal Health Laboratory, within 24 hours of collection. The estimated sensitivity of the rtPCR was 100% (between 92.9% and 100%) and 99.4% specificity (between 98.3% and 100%), with a confidence interval of 95%. Seven isolates of *C. fetus* were obtained; 6 were identified as *C. fetus venerealis*, and 1 as *C. fetus fetus*. The prevalence by bull of *C. fetus* was estimated at 2.2% for culture and isolation, and 2.9% for rtPCR. The farm prevalence of *C. fetus* was 9.7% for culture and isolation, and 12.9% for rtPCR, without finding statistically significant differences between the results, with a confidence interval of 95%. No presence of *Tritrichomona fetus* was found in any of the cultures carried out. In conclusion, is estimated that *C. fetus* is still present in our country, in farms from different regions. In addition, the rtPCR used is a suitable technique for the detection of *C. fetus* directly from samples of preputial smegma as a screening technique.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CAMPILOBACTERIOSIS GENITAL BOVINA

1.1.1 Etiología

La campilobacteriosis genital bovina (CGB) es una enfermedad bacteriana de transmisión venérea que provoca infertilidad temporal, repetición de celos y abortos esporádicos, cuyo agente etiológico es *Campylobacter fetus*. Esta especie se divide en tres subespecies: *C. fetus* subsp. *fetus* (Cff), que causa abortos esporádicos en ovinos y bovinos; *C. fetus* subsp. *testudinum* (Cft), que tiene origen en reptiles y es capaz de infectar humanos (Patrick et al. 2013); y *C. fetus* subsp. *venerealis* (Cfv) (Berg & Firehammer, 1971). La subespecie *venerealis*, a su vez, posee el biotipo *intermedio*. *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* (Cff) es más comúnmente aislado del tracto digestivo de bovinos y ovinos.

El género *Campylobacter* fue propuesto por Sebald & Véron en 1963 para algunas bacterias que habían sido previamente clasificadas bajo el género *Vibrio*. Actualmente este género se denomina *Campylobacter* y pertenece a la familia Campylobacteraceae, que incluye además los géneros *Sulfurospirillum* y *Arcobacter* (LPSN Bacterio.net, 2018). Son bacilos Gram negativos, con forma de "S" en espiral o "forma de gaviota", muy móviles, que miden 0,2 - 0,8 µm de diámetro y 0,5 - 0,8 µm de longitud. Tienen principalmente requisitos microaerófilos (5% de O₂, 10% de CO₂, 85% de N₂) (Kiggins et al. 1956; Vandamme, 2000), aunque algunos son anaeróbicos (LPSN Bacterio.net, 2018). Su metabolismo es respiratorio, oxidasa positivo y reductor de nitratos. Las bacterias del género *Campylobacter* están presentes en diversos lugares de la naturaleza (suelos, agua, animales, plantas, etc.) y algunos son patógenos para humanos y/o animales, produciendo pérdidas económicas graves en la producción animal (enfermedades reproductivas y digestivas) y serios problemas de salud en humanos: diarreas y Enfermedades Transmitidas por Alimentos (Mshelia et al. 2010).

Campylobacter fetus es una de las 38 especies actualmente conocidas del género *Campylobacter* (LPSN Bacterio.net, 2018) y una de las especies más estudiadas del género, debido a su importancia veterinaria por ser uno de los agentes causantes de la CGB. Las subespecies han sido definidas por características fenotípicas y epidemiológicas (preferencias de nicho, hospedero y presentación clínica). La diferenciación genética de las subespecies no ha sido estudiada en profundidad, si bien existen algunos datos de AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) que avalan esta subdivisión (Wagenaar et al. 2001).

Cfv es generalmente el agente causante de la CGB. Esta subespecie tiene preferencia por el tracto genital bovino, y causa infección en el sistema reproductor de las vacas que conduce a un cuadro de disminución de la fertilidad con la muerte temprana del embrión, repetición de celos y abortos esporádicos (Corbeil, 1999). De todas maneras, también la Cff puede causar abortos esporádicos en bovinos por medio de una placentitis (Campero et al. 2003).

1.1.2 Transmisión

La CGB es una enfermedad venérea que afecta al ganado vacuno (Lander et al. 1985). Su principal vía de transmisión es la vía venérea, por monta natural o por inseminación artificial (IA). También hay reportes de transmisión a través de fómites (pipetas de inseminación, vaginas artificiales contaminadas, etc) y a través de semen

infectado de los centros de IA. No hay transmisión horizontal o vertical entre la hembra y su descendencia o entre dos hembras directamente (Newsam et al. 1964).

1.1.3 Patogenia en vacas

Se han propuesto varias explicaciones de por qué disminuye la fertilidad en vacas infectadas con Cfv. Se ha descrito que luego de la invasión de Cfv hacia el útero, se produce una respuesta inflamatoria leve de la pared uterina (endometritis leve definida por lesiones linfocíticas focales y plasmáticas del endometrio) que lo hace inhóspito para el embrión (Peterson et al. 1964; Clark, 1971; Schurig et al. 1974). Esta endometritis puede durar de 3 a 4 meses, lo que explicaría la pérdida de la preñez, los ciclos estrales anormalmente largos y preñeces tardías (Clark, 1971; Schurig et al. 1974). Ware (1980) propuso que el Cfv podría disminuir la tensión de oxígeno disuelto dando como resultado un ambiente inhóspito para que el embrión se adhiera, ya que es altamente dependiente de la tensión de oxígeno del útero antes y después de la implantación. Por último, Stalhem et al. (1975) estudiaron el efecto de Cfv en cultivos de órganos con tejido uterino bovino y descubrieron que Cfv generaba pérdida de cilios y, por lo tanto, movimiento ciliar. Teniendo en cuenta que el embrión depende en gran medida del movimiento ciliar para llegar al útero e implantarse, esto también podría contribuir a la pérdida temprana de embriones en vacas o vaquillonas recién infectadas.

De todas maneras, está claro que después de la infección, la bacteria invade el útero y lo transforma en un entorno agresivo para el embrión. La infección finalmente se elimina del útero, pero puede sobrevivir durante dos años en la vagina (Van Bergen et al. 2005a). Una vez que se ha eliminado por completo, la vaca es inmune a la reinfección durante 2 a 4 años, momento en el cual la mayoría de los animales volverían a ser susceptibles (Corbeil et al. 1981).

Si hay un toro infectado en un rodeo en el que se utiliza 2,5% de toros (1 toro cada 40 vacas), el 60% de las hembras se infectarían en un solo ciclo estral (Newsam, 1960). Otros toros sanos se infectarán cuando monten a vacas infectadas que estén repitiendo celo. Estos toros recién infectados montarán otras vacas sanas y las infectarán, y así sucesivamente durante el entore. Al terminar la época del entore, probablemente el 90% del rodeo de vacas estará infectado y se observarán los síntomas a nivel de rodeo (Carrol & Hoerlein, 1972).

1.1.4 Patogenia en toros

Un macho puede infectarse cuando monta a una vaca infectada o cuando se utiliza una vagina artificial contaminada al extraer semen (Clark, 1971). El prepucio del toro tiene criptas en la región donde la mucosa prepucial se une a la mucosa del pene (fórnix). En ese lugar, Cfv encuentra las condiciones microaerofílicas necesarias para el crecimiento y la multiplicación. Cuanto más profundas son estas criptas, mejores son las condiciones para el Cfv, condición que se podría dar con el envejecimiento de los toros. Según esto, a mayor edad del toro más propenso será a ser portador de Cfv en el prepucio (Wagner et al. 1965). Pero el toro queda como portador asintomático, y no ocurre invasión sistémica ni invasión a otros órganos reproductores (Samuelson et al. 1966; Corbeil, 1999).

Se han realizado distintas investigaciones sobre la incidencia de Cfv en toros viejos y toros jóvenes, la duración y su potencial de infección, y su capacidad de convertirse en toros portadores. Las definiciones de "viejo" y "joven" en diferentes publicaciones varían; Wagner et al. (1965) consideraron toros jóvenes de 6 años o menos; Philpott (1968) consideró a los toros menores de 4 años como jóvenes; Ladds et al. (1973)

establecen el límite como menor o igual a los 3 años de edad. En cualquiera de los límites, estos autores concluyeron que los toros más viejos muestran una mayor probabilidad de ser portadores que los toros más jóvenes. Por otra parte, en los trabajos de Dufty et al. (1975) y Bier et al. (1977) no encontraron diferencias de edad en la incidencia de Cfv en toros. También llegaron a la conclusión de que el uso de toros jóvenes para disminuir la diseminación de la infección por Cfv en un rodeo era de un valor cuestionable (Dufty et al. 1975; Bier et al. 1977).

En el trabajo de Strickland (2010) se estudió la histología de la mucosa prepucial entre toros de 2 años y toros mayores o igual a 5 años de edad. No se encontraron diferencias significativas en el área total del epitelio prepucial, área total abarcada por los pliegues epiteliales del prepucio, ni en el número total de pliegues epiteliales del prepucio por unidad de medida, entre ambos grupos.

En resumen, es relativo afirmar que cuanto más viejo es el toro, más tiempo conserva la infección en las criptas profundas del prepucio, y que el uso de toros jóvenes para disminuir la propagación de la enfermedad no elimina el riesgo. Lo más importante que debe tenerse en cuenta es la cantidad y concentración de bacterias de Cfv viables dentro del prepucio, porque esto representa el inóculo que los toros van a depositar en la vagina de la hembra durante la monta. Este número varía desde 1×10^2 células hasta más de 2×10^5 , una variabilidad que se encuentra no solo entre los toros, sino también en distintas muestras de un mismo toro (Clark, 1971).

1.1.5 Signos clínicos

La CGB se manifiesta clínicamente en las hembras bovinas como una inflamación de la mucosa vaginal y uterina (vaginitis, cervicitis, endometritis y salpingitis), la cual provoca fallas en el implante del embrión (Schurig et al. 1974). La enfermedad se transmite por vía venérea, y el toro infectado es el principal dispersor de la enfermedad ya sea por monta natural o por inseminación artificial (Mshelia et al. 2010; Molina et al. 2013).

Las vacas infectadas sufren una endometritis leve y salpingitis, pero generalmente esto no es observado a nivel de campo debido a la ausencia de signos externos (Hartley, 1952, Cipolla et al. 1994). El principal signo clínico que se puede observar es el retorno anormal al estro de las vacas que ya han sido servidas. Los retornos al estro serán repetidos y con intervalos entre servicios de longitud irregular, tendiendo a ser más largos de lo normal. Al final del servicio, las tasas de preñez pueden ser tan bajas como del 10 al 30% en una duración del entore de 60 días (Te Punga et al. 1958; Newsam, 1960; Carrol & Hoerlein, 1972). Si el entore no tiene una duración determinada, las pariciones pueden extenderse hasta 7 meses o más (Carrol & Hoerlein, 1972).

Después de 2 a 4 retornos al celo, las vacas pueden quedar preñadas y mantener la gestación. Pero entre 1 y 10% de estas vacas abortan entre el 4° y el 7° mes de gestación. Estos abortos presentan lesiones inespecíficas, como la proliferación linfoide y la acumulación focal de células mononucleares en la mayoría de los órganos (Jeffrey et al. 1988). Las vaquillonas infectadas podrán tener un porcentaje de preñez del 20% (Hartley, 1952), pero el porcentaje de preñez general podría alcanzar el 85% (Carrol & Hoerlein, 1972). Con el tiempo, el porcentaje de preñez se estabiliza entre 75% y 85%, dependiendo de la proporción de vaquillonas no vacunadas, y vacas inmunizadas naturalmente que pierden inmunidad a lo largo del tiempo (Carrol & Hoerlein, 1972). La parición se extenderá en el tiempo y ocurrirán abortos esporádicamente (Hartley, 1952). Los toros no infectados se infectan al

montar las vacas infectadas y pueden seguir siendo portadores de por vida según su edad, sin mostrar síntomas externos (Hartley, 1952).

1.1.6 Diagnóstico

La presencia de Cfv puede sospecharse a partir de una correcta anamnesis reproductiva del rodeo y de la presencia de los signos clínicos mencionados. Cuando existe clínicamente esta sospecha, se deben tomar las muestras apropiadas y procesarlas correctamente para poder aproximarse a un diagnóstico acertado.

Existen tres muestras distintas que pueden tomarse frente a la sospecha de la enfermedad:

- Esmegma prepucial de toros,
- Mucus cérvico vaginal de hembras vacías o que hayan abortado,
- Muestras de feto abortado: placenta, líquido abomasal, pulmón e hígado del feto abortado.

El método para la obtención de la muestra puede variar según qué técnica de diagnóstico se utilice.

Se han desarrollado en nuestro país principalmente tres técnicas de diagnóstico:

- Cultivo y aislamiento.
- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) a tiempo final y tiempo real.
- Inmunofluorescencia directa.

1.1.6.1. Obtención de muestras

a) Esmegma prepucial de toros

La muestra de esmegma prepucial puede obtenerse por medio de raspaje prepucial, aspiración, lavado (Tedesco et al. 1977; Clark & Dufty, 1978, Terzolo et al. 1992) o hisopado (Briano et al. 1973, citado por Terzolo et al. 1992).

Los raspadores prepuciales son instrumentos metálicos de 70 cm de largo que tienen un extremo anterior ranurado de aproximadamente 10 cm de largo y 8 mm de diámetro, el cual facilita la acción del raspado sobre los pliegues prepuciales (Tedesco et al. 1977; Terzolo et al. 1992). El raspaje prepucial se realiza primero esterilizando el raspador metálico por fuego directo o ebullición en agua durante 5 minutos. La modificación que se introdujo actualmente fue la de utilizar raspadores de plástico descartables, uno por animal. Luego se higieniza el orificio prepucial: se recortan pelos, se lava con suero fisiológico estéril y se seca. Se procede a introducir el raspador en la cavidad prepucial, intentando evitar el contacto con pelos y la parte externa del prepucio. Una vez dentro del prepucio, se efectúan 20-30 movimientos en sentido antero-posterior con el raspador. Debe hacerse sobre el prepucio y sus pliegues, con la precaución de no raspar el pene. Finalmente se debe extraer el raspador con la precaución de evitar el contacto con pelos y parte externa del prepucio (Tedesco et al. 1977).

En cuanto a la aspiración, originalmente se utilizó la pipeta de Bartlett (1949) (Terzolo et al. 1992), que consistía en un tubo de vidrio de 54 cm de largo y con uno de sus extremos biselado, el cual se introducía en la cavidad prepucial mientras que en el extremo opuesto se colocaba un tubo de látex por donde se aspiraba el material. Actualmente se utilizan las vainas azules descartables de Cassou, las mismas que se emplean para inseminación artificial con pastillas, con el dispositivo metálico de 45 cm de largo por 3 mm de diámetro por el cual se acopla (Terzolo et al. 1992). La aspiración se realiza introduciendo la vaina en la cavidad prepucial y realizando movimientos leves en sentido antero-posterior y simultáneamente aspirando con la pipeta (Campero et al. 2003).

Para los lavados prepuciales se utiliza una pipeta de inseminación artificial, a la que se le conecta un tubo de látex de aproximadamente 60 cm. Este tubo de látex está adosado por su otro extremo a un frasco o jeringa que contiene PBS (Phosphate Buffer Saline). Una vez introducida la solución, se cierra con una mano el orificio prepucial para evitar su salida y se efectúan vigorosos masajes en sentido cráneo-caudal durante aproximadamente 1 minuto. Posteriormente se recoge el líquido en un frasco, dejándolo caer por gravedad a través de la goma (Clark & Dufty, 1978, Terzolo et al. 1992).

Por último, también se ha descrito la técnica de muestreo con hisopado, que si bien no resulta práctico realizarlo a campo, es una técnica que puede disminuir la contaminación de la muestra. Consiste en frotar la mucosa peneana mediante una torunda de gasa adosada a un mango de madera de 14 cm de largo (Briano et al. 1973, citado por Terzolo et al. 1992).

Tedesco et al. (1977) compararon el raspador, la aspiración prepucial con pipeta, y el lavado prepucial. Obtuvieron como resultado significativamente menos contaminación y más aislamientos exitosos de Cfv usando el raspador que los otros dos métodos. No se encontró dificultad en la obtención de la muestra en ninguno de los tres métodos, pero Dufty et al. (1969) mencionan que el uso de la pipeta es incómodo para los toros, y en algunos casos observaron leve presencia de sangrado.

El esmegma prepucial obtenido se puede utilizar directamente para sembrar en el medio de cultivo, o puede descargarse en un tubo con 4 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) con 1% de formalina, para el diagnóstico mediante la prueba de la inmunofluorescencia, como se explicará más adelante. En todos los casos, las muestras deben ser obtenidas bajo las mejores condiciones asépticas posibles, ya que existe gran cantidad de flora contaminante dentro de la cavidad prepucial. El medio de dilución para descargar la muestra de esmegma también ha estado sujeto a mucha investigación. Actualmente, se recomienda el uso de PBS (Hum, 1987; Lander, 1990b; OIE, 2017) pero en el pasado se han utilizado muchos otros medios (por ejemplo, tioglicolato de sodio (Modolo et al. 2000), caldo de peptona (Dufty et al. 1969) y agua peptonada (Tedesco et al. 1977).

b) Mucus cérvico vaginal de hembras vacías o que hayan abortado

Las muestras de mucus cérvico vaginal (MCV) se utilizan para la mayoría de las pruebas de diagnóstico y aislamiento microbiológico. Antes de proceder a obtener la muestra, el área de la vulva debe limpiarse adecuadamente, utilizando alcohol u otro desinfectante. Las heces y el moco seco deben eliminarse de la vulva, seguido de un lavado a fondo, un secado y una limpieza aséptica del área (Benquet Sansone, 2005).

La muestra de MCV puede obtenerse por aspiración o por lavado de la cavidad vaginal. Para la aspiración, se limpia la zona de la vulva y se introduce en la cavidad vaginal una pipeta de inseminación artificial o una pipeta de Cassou (vaina azul), de forma que la parte anterior alcance el cuello uterino (Terzolo et al. 1992). Se succiona suavemente mientras se mueve la pipeta hacia delante y hacia atrás. Se retira la pipeta y el mucus recogido se inocular directamente en un medio de cultivo o en un medio de transporte y enriquecimiento (OIE, 2017).

El MCV también puede recogerse mediante lavado de la cavidad vaginal: se introducen en la cavidad 20-30 ml de PBS con una jeringa unida a una cánula o pipeta de inseminación artificial. El líquido se aspira y se reintroduce en la cavidad cuatro o cinco veces antes de recogerlo y extenderlo directamente en medio de cultivo o de añadirlo a un medio de transporte y enriquecimiento (OIE, 2017). También se puede recoger líquido a partir del lavado de la cavidad vaginal con un

tampón o gasa estéril mantenidos en la vagina durante 5-10 minutos después de introducir PBS. Las muestras de MCV obtenidas por succión pueden diluirse con PBS, o sembrarse directamente en un medio de cultivo o de transporte y enriquecimiento (OIE, 2017).

c) **Muestras de feto abortado**

Las muestras que se recomiendan obtener de un aborto son la placenta y el líquido abomasal, los pulmones y el hígado del feto. Las muestras se deben obtener de forma aséptica y se pueden inocular directamente en un medio de transporte y enriquecimiento, o en PBS con un 1% de formalina para realizar inmunofluorescencia indirecta (OIE, 2017). Si es posible, los medios de transporte deben ser inoculados con muestras de líquido abomasal lo antes posible (Varga et al. 1986; Terzolo et al. 1992). También existe la posibilidad de enviar el feto entero al laboratorio para realizar allí la necropsia completa, lo que permite sacar una muestra menos contaminada, y poder hacer el diagnóstico de otras causas de aborto (Riet-Correa, com. pers.).

1.1.6.2. Técnicas de diagnóstico

a) **Cultivo y aislamiento**

Transporte de muestras

Para mantener la viabilidad del Cfv e inhibir el crecimiento de otros microorganismos contaminantes, las muestras deben enviarse al laboratorio para su aislamiento lo antes posible, o de lo contrario se inoculan en medios de transporte y enriquecimiento.

Dado que Cfv es una bacteria Gram-negativa, en la mayoría de estos medios se incluyen antibióticos para inhibir el crecimiento de bacterias Gram-positivas, y antifúngicos.

Se han desarrollado medios de transporte y enriquecimiento **sólidos** (Clark et al. 1969; Dufty & McEntee, 1969; Clark et al. 1974a; García et al. 1984; Hum et al. 1994; Monke et al. 2002), **semisólidos** (Clark et al. al., 1978; Luechtefeld et al. 1981; Terzolo et al. 1992, Marcellino et al. 2015) y **líquidos** (Bolton et al. 1983; Lander, 1990a y 1990b; McFadden et al. 2004).

Los medios de transporte más utilizados son:

- **Medio de Clark:** medio semisólido que contiene 5-fluorouracilo, sulfato de polimixina B, verde brillante (contra bacterias Gram positivas), ácido nalidíxico y cicloheximida (antifúngico) en una base de suero equino o bovino. Este medio tiene buena calidad, pero su preparación es difícil y lleva mucho tiempo. Se utiliza principalmente en Australia y en Uruguay, en la Dirección de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) para raspados prepuciales, más conocido como T.E.M (Medio de Transporte y Enriquecimiento) (Clark et al. 1978; Repiso et al. 2005).
- **Medio Cary Blair:** es un medio semisólido que contiene tioglicolato de sodio, fosfato disódico, cloruro de sodio, cloruro de calcio al 1% y agua destilada, con los siguientes agentes antimicrobianos: vancomicina, polimixina B, trimetoprim, anfotericina B, y cefalotina (Luechtefeld et al. 1981; Terzolo et al. 1992, Marcellino et al. 2015).
- **Medio de Lander:** caldo líquido que contiene complemento de crecimiento de *Campylobacter* (Oxoid), carbón bacteriológico, sangre equina hemolizada, vancomicina, sulfato de polimixina B, cicloheximida, trimetoprima y 5-fluorouracilo, en una base de caldo Mueller-Hinton. Se utiliza principalmente

para lavados prepuciales y lavados vaginales (Bolton et al. 1983; Lander, 1990a; McFadden et al. 2004).

Procesamiento de las muestras

Las muestras para cultivo y aislamiento deben procesarse preferiblemente dentro de las 24 horas para aumentar la posibilidad de obtener el aislamiento.

Muestras de toros

El objetivo de un correcto muestreo de esmegma prepucial es poder obtener la mayor cantidad de Cfv presentes en las criptas prepuciales. Uno de los problemas para esto es el alto volumen en el cual se descarga la muestra obtenida de esmegma prepucial (desde 4 a 10 mL). Para solucionarlo, se planteó centrifugar las muestras para concentrarlas, inoculando luego el medio de transporte con el pellet (Clark et al. 1969; Clark et al. 1974a; Bier et al. 1977; MacLaren et al. 1988; Lander, 1990b), otros autores dejaron reposar la muestra durante unos minutos antes de inocular el medio de transporte con el sobrenadante (Repiso et al. 2005), y otros filtraron una alícuota de la muestra a través de filtros con un tamaño de poro de entre 0,65 y 0,60 µm (Plumer et al. 1962; Lander, 1990a) y también se combinaron dos o tres métodos (Dufty, 1967; Winter et al. 1967; Clark et al. 1978; von Bispin et al. 1981; Modolo et al. 2000). Todos los métodos han dado buenos resultados, pero no hay un trabajo que compare estos protocolos.

Muestras de vacas

La muestra de MCV puede ser demasiado viscosa y puede ser necesaria la licuefacción. Esto se logra mediante la adición de un volumen igual de una solución de cisteína a la muestra y la espera de 15 a 20 minutos antes de la inoculación de la muestra diluida en cualquier otro medio (OIE, 2017). También se puede filtrar antes de inocularla para el aislamiento o inmunofluorescencia (Shires et al. 1974), o sembrarla directamente en el medio de transporte (Marcellino et al. 2015).

Muestras de feto abortado

La muestra de líquido abomasal se puede inocular directamente en un medio de cultivo. Las muestras de placenta, hígado, y pulmones del feto se flamean para esterilizar la superficie, y luego se homogeneizan y se inocula en medio de cultivo (OIE, 2017).

Medio de cultivo para el aislamiento

Existen medios de cultivo utilizados para el aislamiento de *Campylobacter spp.* que no son adecuados para el *C. fetus* a causa de los antimicrobianos que pueden inhibir el crecimiento de *C. fetus*, como por ejemplo las cefalosporinas (van Bergen et al. 2005b). Como medio selectivo para el aislamiento de *C. fetus* se recomienda el medio de Skirrow. Se trata de un medio con un 5-7% de sangre (lisada) desfibrinada y 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). De forma alternativa, se pueden usar medios no selectivos a base de sangre, como agar Columbia, o agar sangre enriquecido con sangre de oveja o caballo.

Campylobacter fetus es una bacteria microaerófila que necesita una mezcla de gases de no más de 5 a 10% de oxígeno, 5 a 10% de dióxido de carbono y 5 a 9% de hidrógeno para un crecimiento óptimo (Kiggins et al. 1956; Vandamme, 2000). Las condiciones microaerobias pueden establecerse mediante varios métodos. En algunos laboratorios se crea una atmósfera adecuada sustituyendo gas en una jarra. También existen kits para la generación del gas, o se pueden utilizar incubadoras de atmósfera variable (OIE, 2017). Luego de sembrados, los medios se incuban a 37°C en esta

atmósfera microaerobia. Se necesitan entre 4 y 7 días para que las colonias de *Campylobacter fetus* sean visibles. El hecho de no observar colonias de *Campylobacter fetus* después de 4 días no asegura que sea un resultado negativo. Se recomienda verificar las condiciones de cultivo e incubación utilizando cepas control de *C. fetus* subesp. *fetus* y *C. fetus* subesp. *venerealis* cada vez que se intente llevar a cabo un aislamiento (OIE, 2017).

Identificación de colonias de *Campylobacter*

Las colonias de *Campylobacter fetus* miden 1-3 mm de diámetro. Son ligeramente rosas-grisáceas, redondas, convexas, lisas y brillantes y con borde regular (OIE, 2017). Para identificar las colonias en crecimiento se puede realizar una tinción de Gram a partir de un frotis de la colonia sospechosa. El *Campylobacter* presenta una forma de un bacilo curvo, de 0,3 a 0,4 µm de ancho y 0,5 a 0,8 µm de largo, gram negativo. También se pueden observar frotis de colonias vivas en contraste de fases, y se puede distinguir la gran movilidad y forma característica de los bacilos: formas cortas (en forma de coma), media (en forma de S) y largas (helicoidales con varias espirales) (On, 2001).

Caracterización bioquímica

Se han diseñado distintas pruebas bioquímicas o fenotípicas para poder identificar correctamente la especie y subespecie de *Campylobacter* de acuerdo a la respuesta en diferentes condiciones bioquímicas (OIE, 2017). Las pruebas bioquímicas actualmente recomendadas por la OIE (2017) se muestran en el Cuadro I.

Cuadro I. Características diferenciales de varias especies de *Campylobacter* que pueden aislarse del tracto genital bovino y de fetos bovinos abortados (según Bergey's Manual, 2ª edición, 2005, citado por Manual de la OIE 2017).

	25°C	42°C	Oxidasa	Catalasa	NaCl 3,5%	Glicina 1%	H ₂ S
<i>C. fetus</i> subesp. <i>venerealis</i>	V	-V ^(a)	+	V	-	-	-
<i>C. fetus</i> subesp. <i>Fetus</i>	V	V ^(a)	+	+	-	+	+
<i>C. jejuni</i>	-	V ^(b)	+	V ^(c)	-	V	+
<i>C. hyointestinalis</i>	-	+	+	+	-	V	n.d.
<i>C. sputorum</i>	-	+	+	V	+	+	n.d.

(a) Aunque *C. fetus* no es una especie termófila de *Campylobacter*, se ha descrito el crecimiento de esta especie a 42°C;

(b) *C. jejuni* subesp. *jejuni* es positivo, *C. jejuni* subesp. *doylei* es negativo;

(c) *C. jejuni* subesp. *jejuni* es positivo, *C. jejuni* subesp. *doylei* es variable;

(+) reacción o crecimiento positivo y (-) reacción negativa o ausencia de crecimiento de la cepa en un medio adecuado bajo condiciones especificadas

V = resultados variables; n.d. = indeterminado.

Sensibilidad y especificidad del cultivo y aislamiento

En 1947, Yerushalmy introdujo los términos de sensibilidad y especificidad 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*). La sensibilidad y la especificidad 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 cuan "sensible"

es la prueba frente a la presencia de la enfermedad. Se calcula en términos de probabilidad condicional como la probabilidad 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 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*).

La información publicada sobre la sensibilidad de la técnica de diagnóstico bacteriológico utilizando el medio de cultivo Skirrow para *C. fetus* varía desde un 32,7% (García Guerra et al. 2014) a un 40-60% (Dutra 2013, Marcellino et al. 2015). Presenta una baja sensibilidad, por lo tanto puede haber animales portadores positivos que no sean detectados mediante esta técnica, obteniendo resultados Falsos Negativos. Al ser una técnica de baja sensibilidad, se recomienda realizar 3 raspajes cada 7 a 15 días para poder alcanzar una sensibilidad del cultivo del 88% (Dutra, 2013). En cuanto a la especificidad del medio de cultivo Skirrow, distintos autores reportaron un 100% de especificidad (Dutra, 2013; García Guerra et al. 2014; Marcellino et al. 2015). Es decir que el animal sano no portador va a dar negativo, siendo Verdadero Negativo.

b) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Basado en trabajos previos de Wesley et al. (1991), Blom et al. (1995) publicaron una técnica de PCR para la identificación de *C. fetus* a nivel de especie, dirigida a la amplificación de un fragmento del gen 16S ARN ribosomal (ARNr) que codifica para la síntesis de ARN ribosómico. Este gen es omnipresente, es fácil de secuenciar, y hay grandes bases de datos disponibles para la alineación e identificación de la secuencia (Drancourt et al. 2000). Por otro lado, Oyarzabal et al. (1997) seleccionaron secuencias cortas de las regiones hipervariables del gen 16S ARNr para producir primers específicos para la especie *C. fetus*. Este método logró identificar la especie *C. fetus* de otras especies de *Campylobacter*. Hum et al. (1997) publicaron un método de PCR múltiple. En este trabajo se usó dos pares de primers (MG3F, MG4R; y VenSf, VenSR). El primer par de primers se dirige a las especies de *C. fetus* que amplifica una banda de 960 pares de bases (pb) y el segundo par de primers se dirige a específicamente a una banda de 142 pb de *Cfv*. Se analizaron 99 cepas y obtuvieron como resultado un 80,8% de coincidencia entre la PCR y la caracterización bioquímica. Las cepas en las que se produjo la diferencia se volvieron a identificar mediante esta PCR, y los autores atribuyeron las diferencias a la falta de una adecuada estandarización de las pruebas bioquímicas. Esta fue la primera técnica de PCR que aparentemente fue capaz de diferenciar entre *Cfv* y *Cff* y representó un paso adelante de la PCR como una técnica rápida y precisa para la identificación de la presencia de ADN específico de especie.

Luego se desarrolló un método de identificación de especie *C. fetus* basado en el gen *cpn60*, que codifica para una chaperonina de 60-kDa (Chaban et al. 2012). Esta metodología utiliza primers específicos y el flourocromo SYBR green, pero su eficiencia no es muy alta cuando se analizan muestras sin enriquecimiento (Chaban et al. 2012). A su vez, se diseñó un método que utiliza una sonda TaqMan basada en

el gen *parA* para la diferenciación de subespecies de *C. fetus* (McMillen et al. 2006, Chaban et al. 2012; McGoldrick et al. 2013), pero este método necesita ser mejor evaluado, ya que se han detectado reacciones cruzadas entre las subespecies (Spence et al. 2011).

Se han evaluado distintos métodos de PCR (Newell et al. 2000; Wagenaar et al. 2001; Vargas et al. 2003; y Muller et al. 2003) y se han desarrollado otros protocolos (Wang et al. 2002; Tu et al. 2005; van Bergen et al. 2005c; y Abril et al. 2007), con aspectos en común pero también con algunas diferencias (Van der Graaf et al. 2013) (Cuadro II).

Cuadro II. Sensibilidad y especificidad de la identificación de *C. fetus* a nivel de subespecie mediante PCR (OIE, 2017 adaptado de Van der Graaf et al. 2013).

Autor (PCR)	Identificación	Gen	Sensibilidad ^a	Especificidad ^a
Abril et al. 2007	<i>C. fetus</i>	<i>nahE</i>	100% (143/143)	100% (12/12)
	Cfv	<i>ISCfe1</i>	97% (58/60)	100% (95/95)
Van Bergen et al. 2005c	Cfv	desconocido	45% (27/60)	100% (95/95)
Hum et al. 1997	<i>C. fetus</i>	<i>cstA</i>	100% (143/143)	100% (12/12)
	Cfv	<i>parA</i>	58% (46/70)	83% (79/95)
McMillen et al. 2006	Cfv	<i>parA</i>	53% (32/60)	100% (95/95)
Wang et al. 2002	Cff	<i>sapB2</i>	76% (63/83)	72% (52/72)
Van der Graaf et al. 2013	<i>C. fetus</i>	<i>nahE</i>	100% (143/143)	100% (12/12)

El estudio incluyó: 60 cepas de *Cfv*, 83 cepas de *Cff*, 12 cepas no fetales de *Campylobacter*, 95 cepas no *Cfv* y 72 cepas no *Cff* (Van der Graaf et al. 2013).

^a expresado en forma de porcentaje (número de cepas identificadas de forma correcta/número total de cepas).

Cfv: *Campylobacter fetus venerealis*. Cff: *Campylobacter fetus fetus*.

La PCR múltiple descrita por Abril et al. (2007) demostró ser válida para la correcta identificación de *C. fetus*, con un 100% de sensibilidad y un 100% de especificidad, aunque el gen diana *ISCfe1* específico de *Cfv* descrito para esta PCR, dio un 97% de sensibilidad y no puede emplearse para diferenciar entre cepas de *Cff* y de *Cfv* con validez (Van der Graaf et al. 2013). El gen *nahE* puede emplearse para identificar *C. fetus* por PCR convencional y por real time PCR (Van der Graaf et al. 2013; McGoldrick et al. 2013).

Sobre la PCR múltiple descrita por Hum et al. (1997), se hicieron estudios posteriores donde se compararon los resultados de esta PCR con las pruebas AFLP y MLST (Multilocus Sequence Typing) (van Bergen et al. 2005a) y con la prueba de la glicina (Willoughby et al. 2005) y se observó que esta técnica de PCR puede dar tanto falsos positivos como falsos negativos (Van der Graaf et al. 2013). En otro estudio, esta PCR dio 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 este gen diana, resulten inadecuados para el diagnóstico. Las otras PCR mencionadas en el Cuadro II se hicieron con un número muy pequeño de cepas y de pruebas, por lo que habría que seguir generando información.

A pesar de las diferencias que se pueden observar, la PCR como técnica parece ser un método útil para la identificación de la especie *C. fetus*, pero ninguna PCR publicada permite identificar con validez las cepas de *C. fetus* a nivel de subespecie entre Cfv y Cff (OIE, 2017, Van der Graaf et al. 2013).

Se han descrito otros métodos moleculares para la identificación de subespecies de cepas aisladas de *C. fetus*: la secuenciación del gen 16S (Gorkiewicz et al. 2003; On y Harrington, 2001), PFGE (electroforesis en gel de campo pulsado) (On y Harrington, 2001), AFLP análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados) (Wagenaar et al. 2001) y MLST (van Bergen et al. 2005a) y la secuenciación de todo el genoma (Van der Graaf et al. 2014), pero estos métodos son laboriosos y caros para poder realizarlo en los laboratorios de diagnóstico (OIE, 2017).

En el estudio de Iraola et al. (2016) se desarrolló una técnica de rtPCR que se dirige a una región única del gen 16S ARNr de *C. fetus*. Esta técnica demostró tener una sensibilidad del 100% con cepas de *C. fetus*, y una especificidad entre 95 y 100%. No es útil para la detección de subespecies Cfv o Cff, pero es altamente sensible y específica para detección de especie *C. fetus*.

Sensibilidad y especificidad de la PCR

La sensibilidad y especificidad de diferentes técnicas de PCR han sido evaluadas en base a cepas aisladas de *C. fetus*, Cfv y Cff, obteniendo valores de 100% de sensibilidad y 100% de especificidad para la correcta detección de especie *C. fetus*, pero siendo muy variables para la detección de subespecie Cff o Cfv (Cuadro II, Van der Graaf et al. 2013). En un protocolo de rtPCR para la detección de Cfv probado directamente a partir de muestras de campo (García Guerra et al. 2014) obtuvieron una sensibilidad de 85,4% y una especificidad de 85%. La rtPCR publicada por Iraola et al. (2016) obtuvo una sensibilidad del 100% (entre 94% y 100%, con un intervalo de confianza de 95%), y una especificidad de 100% (entre 59% y 100%, con un intervalo de confianza de 95%) para correcta detección de cepas de *C. fetus*.

Las técnicas moleculares de PCR han sido 100% sensibles y 100% específicas para detectar la especie *C. fetus* (Hum et al. 1997; Abril et al. 2007; Van der Graaf et al. 2013). Pero parece ser que no hay una correlación exacta entre la caracterización bioquímica y la detección o identificación por PCR de las subespecies Cfv y Cff (Hum et al. 1997; Wang et al. 2002; Van Bergen et al. 2005c; McMillen et al. 2006; Abril et al. 2007; Van der Graaf et al. 2013).

c) Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia (IF) puede aplicarse para la identificación del microorganismo de forma directa a partir de muestras, o para confirmar la identificación de una cepa después del aislamiento. Sin embargo, esta prueba tiene como desventaja que no permite diferenciar entre las subespecies Cff y Cfv.

Mellick et al. (1965) utilizaron por primera vez la técnica de anticuerpos fluorescentes en lavados prepuciales, con resultados de coincidencia completa entre la inmunofluorescencia y el aislamiento microbiológico de Cfv. Sin embargo, esta técnica presentó la desventaja de tener reactividad cruzada con Cff. Luego, Winter et al. (1967) evaluaron el uso de IF y el aislamiento. Un total de 269 muestras de esmegma prepucial de 145 toros se procesaron usando ambas técnicas. Se encontró una coincidencia en 122 muestras negativas y 44 muestras positivas. 12 toros fueron positivos solo para IF y 8 solo para aislamiento. Como conclusión, sostienen que aunque ambas técnicas son útiles, deberían tomarse muestras seriadas, que ninguno

de los dos métodos de diagnóstico debería usarse solo, y que un único resultado negativo en ambas técnicas no debería considerarse definitivo. En el mismo año, Dufty (1967) encontró que 94 de las 100 muestras de esmegma prepucial recogido utilizando la pipeta de Bartlett evaluadas por IF, dieron resultados positivos, aunque también hubo reacción cruzada con Cff. Esta técnica fue la que tuvo mayor sensibilidad comparada con los cuatro métodos utilizados en esta investigación (cultivo y aislamiento en medio selectivo, cultivo y aislamiento después de una filtración, y aislamiento después de la congelación con glicerol). De todas maneras, indicó que se deberían hacer al menos cuatro muestreos en serie antes de diagnosticar un animal como negativo. Lein et al. (1968) y Ruckerbauer et al. (1974) coinciden con resultados similares.

En hembras, se propuso utilizar esta técnica con fines de screening previo para establecer un estatus a nivel de rodeo (Carroll & Hoerlein, 1972), pero Shires et al. (1974) criticaron esta estrategia considerando que la presencia de Cff es poco frecuente en todas las muestras excepto en los abortos. En este caso, la filtración del MCV mejoró los resultados de la IF, al eliminar la interferencia de sangre o material purulento en la muestra, y otros contaminantes que puedan generar fluorescencia.

En 2002, la técnica de IF se validó formalmente, comparando la sensibilidad, especificidad, límite de detección y efectos del observador (Ferreira Figueredo et al. 2002). La sensibilidad y especificidad para diferenciar Cfv de otras especies de *Campylobacter* fue 92,6% y 88,9% respectivamente, y los límites de detección fueron 1×10^4 UFC/ml en muestras prepuciales en PBS y no centrifugadas, y 1×10^2 UFC/ml para muestras centrifugadas. No hubo efecto del observador en los resultados finales. El límite de detección de la IF en lavados prepuciales centrifugados según Ferrerira Figueredo et al. (2002) fue mayor que el encontrado por Eaglesome & García (1997) usando PCR para la detección de *C. fetus* subsp. *venerealis* en semen bovino (3 UFC/ml).

La IF se sigue utilizando, tanto para muestras de esmegma prepucial como para confirmación de cepas aisladas en cultivos. El límite de detección, los contaminantes presentes y el procesamiento de las muestras son los puntos críticos que influyen en la sensibilidad para detectar los positivos (Ferreira Figueredo et al. 2002).

1.1.7 Tratamiento

Se han estudiado diferentes posibles tratamientos de toros portadores, con resultados variables. Las primeras pruebas consistieron en los siguientes tratamientos:

- lavados prepuciales diarios con 0,5 a 1 litros de una solución al 3% de hidrógeno peroxidasa seguido de 300 ml de una solución acuosa al 0,5-0,7% de clorhidrato de furaltadona (Winter et al. 1967);
- lavados prepuciales con una combinación de penicilina y estreptomina (Clark, 1971).

Posteriormente se realizaron trabajos utilizando clorhidrato de dimetridazole (Campero et al. 1987), y metanosulfonato de dimetridazole (Stoessel y Haberkorn, 1977; Palladino et al. 1983) con resultados exitosos, pero estos principios activos ya no se encuentran en el mercado, y por lo tanto no es viable su utilización.

También se realizaron otros trabajos utilizando tratamiento sistémico con oxitetraciclina con resultados de 100% de eficacia (von Bispin et al. 1981; Campero et al. 1993), y otra prueba con 2 grupos de toros infectados, uno con tratamiento sistémico con oxitetraciclina, y otro con tratamiento sistémico más tratamiento local también con oxitetraciclina, repetidos a las 72 horas (Cipolla et al. 2000) con 95% de

eficacia. También ha sido utilizada la estreptomicina (Campero et al, 1993; Tuyers et al. 2014) con resultado eficaz.

A su vez, se deberían realizar 4 muestreos negativos consecutivos luego de realizado el tratamiento para diagnosticar a los animales como libres de la enfermedad teniendo en cuenta que los toros tratados con éxito son susceptibles de reinfección en cuanto vuelvan a estar expuestos en un rodeo infectado (Dufty, 1967; Clark, 1971).

En las vacas, es difícil aplicar un tratamiento eficaz. Hartley (1952) informó un tratamiento exitoso de las vacas mediante la inyección intrauterina de soluciones de estreptomicina o combinaciones de penicilina y propamidina. Te Punga et al. (1958) previnieron con éxito la enfermedad mediante irrigación uterina de una solución de estreptomicina cuatro días después de inseminar vaquillonas con semen infectado. Después de estas publicaciones iniciales y la aparición de la vacunación como un método efectivo de control y prevención en las vacas, hizo que se deje de lado la investigación sobre el uso de antibióticos como tratamiento en hembras (Benquet Sansone, 2005).

Se introdujo la vacunación como una herramienta para el control y la prevención de la enfermedad, pero también como tratamiento con efecto curativo (Clark, Dufty y Monsborough, 1968). Esto fue confirmado por estudios posteriores (Bouters et al. 1973; Clark et al. 1974b; Palladino & Campero, 1983) donde informaron que el poder curativo de la vacuna contra la infección con la cepa homóloga fue del 100%. En los trabajos donde utilizan vacuna contra la infección homóloga se observó buena respuesta curativa y alta reacción sistémica a anticuerpos (Bouters et al. 1973; Palladino & Campero, 1983; Vasquez et al. 1983). En trabajos donde utilizan cepas de otro origen no se obtuvieron buenos resultados de curación ni respuesta de anticuerpos (Hum et al. 1993; Campero et al. 2010).

1.1.8 Control y prevención

Los métodos de control de la CGB descritos hasta el momento se basaban en la revisión y descarte de los toros positivos previo al servicio, el reemplazo con toros jóvenes negativos (Hartley, 1952; von Bispin et al. 1981), y sobre todo la vacunación de hembras previo al servicio (Palladino & Campero 1983; Cipolla et al. 1992). También existen medidas de manejo como la separación de rodeos infectados y no infectados, el uso de toros vírgenes o sanos con vacas y vaquillonas libres, (Hartley, 1952), y el desarrollo de técnicas de inseminación artificial.

La vacunación como herramienta para el control y la prevención comenzó a desarrollarse en la década de 1960. Los primeros trabajos mostraron que la inyección subcutánea de una suspensión de células de Cfv producía una rápida recuperación de la fertilidad en vaquillonas (Te Punga, 1962).

Michi et al. 2016 publicaron una revisión exhaustiva sobre enfermedades venéreas y el desarrollo de vacunas. La vacunación sistémica de toros con antígenos de *C. fetus venerealis* ha sido eficaz para prevenir la infección a nivel prepucial (Vasquez et al. 1983; Bouters et al. 1973; Clark et al. 1974b). En el estudio de Clark et al. (1974b), se administró una vacuna sistémica con antígenos de *C. fetus venerealis* (con 40 mg de materia seca) en adyuvante oleoso (aceite mineral) a 16 toros, dos veces con un intervalo de 2 meses, y luego anualmente. Luego estos toros fueron desafiados experimentalmente a nivel intraprepucial con *C. fetus venerealis* cada 6 meses (un total de cinco veces) y se consideraron libres de infección después de 4 cultivos semanales consecutivos de esmegma prepucial negativos (Clark et al. 1974b). En ese estudio, los 16 toros vacunados estaban libres de la infección, mientras que de 17 toros desafiados no vacunados, 13 se infectaron durante al menos 3 meses, 2 se

infectaron durante menos de 2 semanas y solo los 2 restantes permanecieron libres de la infección (Clark et al. 1974b). Las edades a las que los toros se infectaron oscilaron entre 2 y 6 años (Clark et al. 1974b). Asimismo, en el trabajo de Clark et al. (1979), se administró una vacuna bivalente que contenía antígenos *C. fetus venerealis* y *C. fetus venerealis* biotipo *intermedius* (20 mg de cada uno) a 10 toros (de 20 -34 meses) utilizando el mismo protocolo de vacunación y desafío. Los cinco toros desafiados con *C. fetus venerealis* y los cinco toros desafiados con *C. fetus venerealis* biotipo *intermedius* permanecieron libres de la infección, mientras que 9 de 10 toros del grupo control no vacunados y desafiados, se infectaron durante al menos 5 semanas después del desafío (Clark et al. 1979). Las edades a las que los toros se infectaron oscilaron entre 3,5 y 5,5 años (Clark et al. 1979).

La vacunación sistémica de las vacas con una cepa de Cfv se asoció con la prevención de la infección y la posible curación. La vacunación sistémica de vacas con *C. fetus venerealis* y *C. fetus venerealis* biotipo *intermedius* (20 mg de peso seco de cada uno) con adyuvante oleoso, protegió contra la infección experimental vaginal con ambos microorganismos (Clark et al. 1977). En otro estudio con vaquillonas, se vacunó con una bacterina conteniendo antígeno capsular K, y estas se mantuvieron resistentes a la infección experimental con el *C. fetus* (Border & Firehammer, 1980). Además, la inmunización sistémica con células muertas de *C. fetus* en adyuvante oleoso de Freund también curó la infección en 6 de las 8 vacas infectadas previamente con *C. fetus venerealis* (Schurig et al. 1975). Estos efectos protectores y curativos de la vacunación sistémica se han asociado en gran medida con la inducción de la respuesta inmune y producción de anticuerpos. Las vacunas sistémicas con bacterinas de *C. fetus* en adyuvante oleoso estimularon altas concentraciones sistémicas y a nivel genital de anticuerpos IgG1 e IgG2 (Corbeil et al. 1974; Corbeil et al. 1981).

Se han realizado otros estudios sobre el patrón de secreción de inmunoglobulinas producidas por las vacunas. En las vacas, la IgG y la IgA aumentaron tanto en el suero como en la mucosa vaginal después de la vacunación, aunque no se observó una relación constante entre ambas (Schurig et al. 1975). En los toros, la difusión de IgG e IgM hacia el prepucio junto con la secreción local de IgA se produce después de la vacunación aunque en bajas cantidades (Van Aert et al. 1976). Border & Firehammer (1980) informaron que los antígenos capsulares K del Cfv son los que generan la respuesta inmune. Investigación adicional mostró que los anticuerpos contra los antígenos capsulares K se secretaron 4 semanas después de la vacunación y los anticuerpos contra el antígeno somático "O" se secretaron dentro de las 6 semanas de la vacunación (Vasquez et al. 1983).

Según Hjerpe (1990), las vacunas desarrollan inmunoglobulinas del tipo IgG contra antígenos capsulares K lábiles al calor del Cfv. Estas IgG difunden hacia la vagina y el útero. La presencia de IgG en la vagina no dura mucho tiempo y puede producirse una invasión bacteriana, aunque no se pierde la fertilidad. En los toros, la inmunización da como resultado la presencia de IgG, IgM e IgA en la cavidad prepucial. Por lo tanto, la vacunación evitará la infección de los toros y la transmisión de la enfermedad a las vacas susceptibles (Hjerpe, 1990).

Se evaluó la inmunidad contra Cfv utilizando vacunas formuladas con Cff, ya que comparten antígenos entre sí (Bouters et al. 1973; Clark et al. 1975). En el trabajo de Bouters et al. (1973), la vacuna contra *C. fetus* subesp. *fetus* confirió inmunidad contra *C. fetus* subesp. *venerealis*. Otros resultados encontraron que existe protección cruzada contra Cfv a partir de las vacunas elaboradas con Cff (Eaglesome et al. 1986), también con vacunas elaboradas con Cfv biotipo *intermedio* (Johns et al.

1977), e incluso con vacunas bivalentes preparadas a partir de cepas de *Cfv* y *Cfv* biovar *intermedius* (Clark et al. 1977). También se ha evaluado la eficacia de vacunas con células muertas de *Cfv* en hembras con buenos resultados (Schurig et al. 1978).

A pesar de las publicaciones que informan buena eficacia de la vacuna, también se han informado fallas en la respuesta. Dos vacunas comerciales formuladas con *C. fetus venerealis* administradas por vía subcutánea en vacas, no las protegieron contra la infección de *C. fetus venerealis* cuando fueron desafiadas de forma natural con un toro infectado durante 60 días (Cobo et al. 2003). A pesar de la vacunación, tanto los grupos vacunados, como los controles, tuvieron un alto porcentaje de vaquillonas infectadas y ambos grupos tuvieron bajos porcentajes de preñez (Cobo et al. 2003). En un experimento de Hum et al. (1993), la vacunación terapéutica falló en un toro de 4 años infectado con *C. fetus venerealis*, ya que permaneció infectado después de la inmunización sistémica con dos vacunas comerciales, con 2 y 3 revacunaciones respectivamente.

Actualmente en el mercado existen vacunas polivalentes para la prevención de enfermedades reproductivas comunes que han desarrollado los laboratorios comerciales. Cobo et al. 2003 evaluaron la eficacia en la prevención de la CGB de una vacuna polivalente que contiene *Leptospira interrogans serovar pomona*, *Haemophilus somnus*, *Cff*, *Cfv*, IBR y antígenos BVD en adyuvante de hidróxido de aluminio; comparado con otra vacuna que contiene los mismos antígenos excepto *Haemophilus somnus* (Cobo et al. 2003). Se encontró que estas vacunas no producían una correcta inmunidad contra *Cfv*.

Las fallas en las vacunas contra la CGB se pueden atribuir a dos factores: las diferencias antigénicas entre las cepas locales y las cepas estándar utilizadas en la elaboración de las vacunas, y/o debido al contenido insuficiente de peso seco de células de *C. fetus* (menos de 40 mg de peso seco) (Michi et al. 2016). Puede haber una variación de los antígenos de superficie entre las cepas locales de *C. fetus venerealis* y las cepas internacionales de referencia utilizadas para la elaboración de vacunas, que puede impedir el reconocimiento por parte del sistema inmune cuando se produce la infección en un animal vacunado, y en consecuencia inducir una respuesta inmune limitada (Michi et al. 2016). A su vez, se ha encontrado que vacunas elaboradas con cepas foráneas o muy antiguas no aportaron una correcta protección (Corbeil et al. 2003; Cobo et al. 2003; Jimenez et al. 2011). El peso seco de antígeno por dosis puede determinar la efectividad de una vacuna, ya que las vacunas experimentales indujeron una fuerte protección contra la infección genital solo cuando contenían al menos 40 mg de peso seco por dosis en el adyuvante oleoso (Clark et al. 1977).

1.2 TRICOMONIASIS GENITAL BOVINA

La Tricomoniasis Genital Bovina (TGB) es producida por *Tritrichomona foetus* (*T. foetus*), un protozooario piriforme eucariota flagelado, de aproximadamente 8-18 µm de largo y 4-9 µm de ancho. Taxonómicamente *T. foetus* pertenece al Dominio *Eukarya*, Reino EXCAVATA, Phylum PARABASALIA, Orden Trichomonadida, Familia Tritrichomonadinae. Presenta tres flagelos anteriores que se originan en el blefaroplasto o cuerpo parabasal, y uno posterior o recurrente, que acompaña a la membrana ondulante (Warton & Honigberg, 1979).

El lugar de la infección en los toros es principalmente la cavidad prepucial (Parsonson et al. 1974; BonDurant, 1997), pero es clínicamente asintomática y no

causa cambios patológicos graves. La transmisión de la infección tiene lugar a través de la monta natural, o mediante inseminación artificial con instrumentos contaminados, o mediante el examen del aparato genital de las vacas. En los toros mayores de 3-4 años raramente tiene lugar la recuperación espontánea, de tal modo que se convierten en una fuente permanente de infección en el rodeo. En los toros menores de 3-4 años, la infección puede ser transitoria (OIE, 2012).

En las vacas infectadas, la lesión inicial es una vaginitis, que puede continuar en las vacas preñadas con la invasión a través del cérvix hacia el útero. Pueden aparecer varias secuelas, como una placentitis que provoca aborto entre 1 y 16 semanas, secreción uterina y piómetra. Luego de la infección, las vacas pueden presentar ciclos estrales irregulares, secreción uterina, piómetra o aborto (BonDurant, 1997; Fitzgerald, 1986; Skirrow & BonDurant, 1988). Generalmente, las vacas se recuperan y se hacen inmunes, al menos durante la duración de ese servicio (BonDurant, 1997; Fitzgerald, 1986; Soulsby, 1982).

El diagnóstico de la TGB se basa en una correcta anamnesis e historia clínica del rodeo, con presencia de problemas reproductivos, signos clínicos de aborto, repetición de celos, o celos irregulares, y se confirma la infección cuando se observan los microorganismos en los medios de cultivo (OIE, 2012). Las muestras de esmegma prepucial, mucus vaginal y feto abortados se obtienen de la misma manera que para la CGB (Schonmann et al. 1994; Kittel et al. 1998; Parker et al. 1999; Mukhufhi et al. 2003; de Manual de la OIE, 2012).

La prueba de diagnóstico más común para la TGB es el cultivo de la muestra obtenida. Los medios más usados son el medio Diamond para tricomonas o kits comerciales de cultivo, como el llamado InPouchTM (Bryan et al. 1999; Eaglesome & García, 1992; Parker et al. 2003; Ribeiro, 1990).

También se han desarrollado técnicas moleculares basadas en la PCR para la identificación de *T. foetus* (Cobo et al. 2007; Felleisen et al. 1997; 1998; Parker et al. 2001). La PCR ofrece varias posibles ventajas, como una alta sensibilidad analítica, un diagnóstico más rápido, y el hecho de que los microorganismos de la muestra recogida no tienen que ser viables al momento del procesamiento (OIE, 2012).

Se han realizado estudios sobre el control de la enfermedad probando la inmunización sistémica en toros con antígenos de *T. fetus* (Clark et al. 1983; Clark et al. 1984) donde se evaluó la prevención o eliminación de la infección genital artificial, utilizando como técnica de evaluación y diagnóstico el cultivo de muestras de esmegma prepucial, con resultados satisfactorios.

También se han realizado pruebas de vacunas con *T. foetus* en vacas, pero se requiere más investigación para evaluar los antígenos, ya que un análisis reciente de la eficacia de las vacunas con células completas muertas de *T. foetus* concluyó que la vacunación de vaquillonas tiene un éxito limitado para la prevención y control de la enfermedad (Baltzell et al. 2013).

2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Se diagnosticó la CGB por primera vez en Uruguay en el año 1967 (Stella y Canavez, 1971) comprobándose posteriormente su amplia distribución en la cuenca lechera del sur del país (Tedesco et al. 1976). Luego, Errico et al. (1976) lograron aislar 50 cepas de *Campylobacter fetus* a partir de 103 muestras remitidas de raspaje prepucial, mucus vaginal, tejido placentario y fetos abortados. Se tipificaron por pruebas bioquímicas 38 cepas de *Campylobacter fetus venerealis*, 10 cepa de *C. fetus venerealis* biotipo *intermedio*, y 2 cepas de *Campylobacter fetus fetus* (Cff) siendo la primera vez que se aisló Cff asociado a síndrome de infertilidad y abortos bovinos.

En el Uruguay en ganado de carne, la enfermedad fue diagnosticada en 37% de los establecimientos y en el 28% de los toros analizados mediante inmunofluorescencia, obteniendo el cultivo y aislamiento en 47 muestras de las 1.754 analizadas (2,6%) (Repiso et al. 2005). De los 47 aislamientos de *C. fetus*, el 75% fue biotipificado como *C. fetus subsp. venerealis* y el 25% restante como *C. fetus subsp. fetus* (Repiso et al. 2005). Por su parte, la Tricomoniasis Bovina tiene nula o muy baja prevalencia en Uruguay (Repiso et al. 2005), pero es de rutina el análisis de ambas enfermedades conjuntamente, ya que presentan signos clínicos y patogenia similar.

Otros estudios hechos en nuestro país encontraron que el 34% de los abortos remitidos al laboratorio de diagnóstico de la DILAVE eran de etiología bacteriana, ubicándose el *Campylobacter fetus* en tercer lugar como principal etiología de abortos, con un 12,9% de 431 casos estudiados entre 2002 y 2005 (Easton, 2006).

El promedio de la tasa de preñez nacional fue de 77,8% (2017, XV Taller de evaluación de los diagnósticos de gestación vacuna, INIA) y la tasa de procreo se ha mantenido estable a lo largo de los años, entre 60 y 70%, llegando a 72% en 2011 (INIA, 2012). Las pérdidas reproductivas reportadas entre el diagnóstico de gestación y el destete han sido entre 7,9 % (de Nava, 2011) y 10,3% (Bidondo et al. 2010). Influyen en estas pérdidas factores nutricionales, de manejo y agentes infecciosos a los cuales se les puede atribuir más de un 50% de las fallas reproductivas (Campero et al. 2003). Entre esas causas, se encuentra la CGB, enfermedad que se encuentra distribuida mundialmente según la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2017).

Si bien existen vacunas nacionales e importadas para la prevención de la CGB, no hay información en Uruguay sobre la eficiencia de estas vacunas a campo. Según una encuesta realizada, solamente el 4% de los productores declaró vacunar para prevenir la enfermedad (Repiso et al. 2005). Para que las vacunas sean eficientes es recomendable que contengan cepas autóctonas antigénicamente aptas. Sin embargo no hay un relevamiento actual de las cepas bacterianas que circulan en Uruguay comparado con las cepas que se usan en las vacunas que permitan determinar cuál vacuna es la más adecuada para combatir esta enfermedad.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los principales problemas para el control de *C. fetus* es la complejidad en su diagnóstico, en la tipificación de las subespecies y en la sensibilidad y especificidad de las técnicas de diagnóstico utilizadas. Las técnicas de cultivo y pruebas bioquímicas como método fenotípico son lentas y requieren personal especializado, ya que *C. fetus* es una bacteria difícil de cultivar en el laboratorio (Dekeyser 1984; Smibert 1984). Los métodos inmunológicos de unión a anticuerpos específicos desarrollados para *C. fetus* presentan también dificultades técnicas, además de tener la desventaja de que pueden dar reacción cruzada con otras especies de *Campylobacter* o géneros relacionados. Para la diferenciación de Cff y Cfv, la OIE (2017) recomienda la utilización del test fenotípico de tolerancia a 1% de glicina (Cfv es negativo y Cff positivo). Sin embargo, este test puede arrojar resultados ambiguos por la presencia de mutaciones puntuales (Hum et al. 1997; McGoldrick et al. 2013). Otro ensayo bioquímico aceptado es la producción de sulfuro de hidrógeno (H₂S) en medio sensible, para la cual Cfv es negativo y Cff es positivo (Cuadro I). En base a este último test, se define el Cfv biotipo *intermedio*, ya que es negativo para la tolerancia a 1% de glicina y positivo para la producción de H₂S. Ensayos adicionales han sido probados, incluyendo algunos de resistencia a antibióticos como el ácido nalidíxico, pero ninguno de ellos da resultados concluyentes, ya que existen ambigüedades en los resultados obtenidos con las diferentes pruebas.

Dentro de los métodos moleculares de diagnóstico, los basados en PCR en tiempo real tienen varias ventajas para la detección de *C. fetus*. Son métodos muy sensibles, por lo que pueden ser utilizados con éxito aun en muestras con bajas cargas bacterianas y sin un paso de enriquecimiento previo, lo cual disminuye la dificultad y el costo de la logística para la toma de muestras, facilitando la tarea de los veterinarios de campo. Tienen una especificidad muy alta, y pueden ser adecuadamente estandarizados. Además, la amplificación y detección del amplicón se realiza en una sola reacción con el tubo cerrado, lo cual minimiza el riesgo de contaminación cruzada. Estas metodologías son fácilmente automatizables, permitiendo analizar gran cantidad de muestras en poco tiempo. Actualmente la OIE recomienda los métodos moleculares para la diferenciación de subespecies, si bien se advierte que dan resultados ambiguos en algunos casos (Cuadro II).

Dada la diversidad de metodologías moleculares desarrolladas al momento para la detección y caracterización de las subespecies, Van der Graaf et al. (2013) realizaron un estudio donde probaron todas las metodologías de diferenciación de subespecies disponibles. Su conclusión fue que ninguna de las herramientas moleculares que han sido desarrolladas presenta una concordancia total con la determinación bioquímica de las subespecies. Este análisis indicó la falta de especificidad de las técnicas desarrolladas hasta el momento. Esta falla se debe principalmente a que los genes blanco utilizados en todas las metodologías disponibles no han sido identificados a partir de la comparación de datos genómicos que comprendan toda la variabilidad existente en *C. fetus*. Esto se debe a la escasa información genómica disponible para la especie *C. fetus*, y para las subespecies Cff, Cfv y Cfv biotipo *intermedio*. Es necesario aumentar de forma significativa la disponibilidad de información genómica de estos organismos, ya sea para continuar el desarrollo de metodologías de caracterización molecular, como para profundizar en el conocimiento de su evolución genómica. Un problema para el diagnóstico parece ser que las subespecies de *C. fetus* tienen muchas características en común tanto a nivel genómico como fenotípico (Van der Graaf et al. 2013), y por lo tanto surge la interrogante de si es

necesario que una técnica de diagnóstico molecular PCR deba diferenciar entre Cfv y Cff, o simplemente detectar la especie *C. fetus* a partir de una muestra, como orientación para el diagnóstico. Se debería seguir investigando a nivel genómico y molecular para poder aclarar este punto.

4. HIPÓTESIS

Campylobacter fetus y *Tritrichomona foetus* se encuentran presentes en muestras de esmegma prepucial obtenidas de toros de descarte enviados a faena y de establecimientos con sospecha de la enfermedad en Uruguay.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

Detectar la presencia de *Campylobacter fetus* y *Tritrichomona foetus* en muestras de esmegma prepucial de toros en Uruguay.

Objetivos específicos

- Aislar e identificar *Campylobacter fetus* de distintos toros y establecimientos.
- Aislar e identificar *Tritrichomona foetus* de distintos toros y establecimientos.
- Estimar la prevalencia por toro, por establecimiento, por edad y por raza de ambos agentes etiológicos.
- Comparar una técnica de rtPCR para la detección de *C. fetus* con el cultivo y aislamiento (considerada como la técnica *gold standard*), a partir de una misma muestra de esmegma prepucial, para estimar la sensibilidad y especificidad de la rtPCR.
- Obtener aislamientos de *Campylobacter fetus* para estudios moleculares y genómicos posteriores.

6. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN

El trabajo se realizó desde setiembre 2015 a diciembre 2017 en 2 etapas. La primera etapa fue desde setiembre 2015 a setiembre 2016, donde se puso a punto y estandarizó la metodología de obtención de muestras, procesamiento en el laboratorio para el cultivo y aislamiento, y la puesta a punto de la rtPCR a partir de muestras de esmegma prepucial.

La segunda etapa fue desde setiembre 2016 hasta diciembre 2017, donde se obtuvieron muestras de esmegma prepucial de toros en establecimientos con sospecha de la enfermedad y en toros de descarte en plantas de faena.

6.1 Puesta a punto de la metodología

En la primera etapa se obtuvieron 166 muestras. Se realizaron pruebas con los medios de transporte y enriquecimiento de Clark (medio T.E.M), Lander, Cary Blair, o solamente en PBS. Se evaluó el tiempo transcurrido desde que se obtenía la muestra hasta que llegaba al laboratorio, y se realizaron pruebas de observación utilizando cepas de referencia ATCC (American Type Culture Collection) de *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* en medio de cultivo Skirrow, en estufa a 37° durante 7 días sucesivos, con el objetivo de establecer la mejor combinación y metodología posible como para poder obtener aislamientos positivos. La conclusión de esta prueba fue que lo más eficaz era descargar la muestra de esmegma prepucial directamente en PBS, luego transportarla en conservadora isotérmica sin refrigerante, y sembrarla en el medio Skirrow en el laboratorio entre las 4 a 6 horas después de obtenida (datos no publicados). La rtPCR utilizada fue la citada por Iraola et al. 2016, la cual se puso a punto en el Laboratorio de Genética de Microorganismos de la Sección Genética Evolutiva de Facultad de Ciencias.

El cultivo de *Tritrichomona foetus* se agregó a la estrategia de investigación con la finalidad de conocer la presencia o ausencia de este agente. Se puso a punto la metodología utilizando el medio de cultivo Diamond TYM (BonDurant, 1997) para *Tritrichomona foetus* en el Laboratorio de la Plataforma de Salud Animal de INIA La Estanzuela.

6.2 Muestreo de toros

En la segunda etapa se obtuvieron 315 muestras de esmegma prepucial de toros, las cuales se procesaron y analizaron todas con el mismo protocolo.

Se obtuvieron muestras de toros en establecimientos con sospecha de la enfermedad (repetición de celo, abortos, etc.) y en toros de descarte enviados a faena, considerando la ventaja de obtener mayor cantidad de muestras, de distintos orígenes, razas y edades. En el caso de los toros de establecimientos con sospecha de la enfermedad se tomaron muestras de esmegma prepucial con raspador descartable (modificado de Tedesco et al. 1977). En el caso de los toros de descarte enviados a plantas de faena, se tomaron las muestras de esmegma prepucial a partir de la obtención durante la faena de la porción completa del pene y prepucio, utilizando un raspador con forma de espátula o cuchara (modificado de Briano et al. 1973, citado por Terzolo et al. 1992).

7. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron en total 12 muestreos, obteniendo 315 muestras de esmegma prepucial de toros de 62 establecimientos 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 A1, A2, A3; B1, B2, B3, etc). Se registró el número de caravana individual del toro, la raza, la edad estimada en años, 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, rtPCR para *C. fetus*; y cultivo para *T. foetus*.

7.1 Muestras de esmegma prepucial de toros

Se obtuvieron muestras de esmegma prepucial en 4 establecimientos con sospecha de la enfermedad, donde se obtuvieron 70 muestras de esmegma prepucial (Cuadro III).

Cuadro III. Información de los establecimientos muestreados con sospecha de la enfermedad.

Establecimiento	Departamento	Sistema Productivo	Número de muestras	Pérdidas reproductivas*
H	Río Negro	Lechería	2	30%
M	Florida	Lechería	15	12%
S	Paysandú	Ganadería	25	25%
U	Paysandú	Ganadería	28	20%

* Suma estimada de las pérdidas por falta de preñez más las pérdidas de preñez entre el diagnóstico de gestación y el parto.

Las muestras se obtuvieron siguiendo un protocolo descrito por Tedesco et al. (1977) modificado con la utilización de raspadores descartables:

- Se higienizó el orificio prepucial recortando los pelos del prepucio. En caso de haber barro u orina, se lavó con suero fisiológico estéril y luego se secó con papel higiénico descartable.
- Se introdujo el raspador descartable en la cavidad prepucial, intentando evitar el contacto con pelos y la parte externa del prepucio.
- Se efectuaron 20-30 movimientos en sentido antero posterior sobre el prepucio y sus pliegues, con la precaución de no raspar el pene.
- Se extrajo el raspador con la precaución de evitar el contacto con pelos y parte externa del prepucio.

El material colectado en el raspador fue descargado en tubos individuales identificados, con 4 ml de PBS y puestos en conservadora isotérmica sin refrigerante. También se obtuvieron muestras en 2 plantas de faena habilitadas; el frigorífico matadero Los Olivos S.A en el departamento de Paysandú, y el Frigorífico Schneck S.A en el departamento de Montevideo.

En Los Olivos S.A se hicieron 3 muestreos diferentes donde se obtuvieron 29 muestras, mientras que en el Frigorífico Schneck se realizaron 5 muestreos diferentes donde se obtuvieron 216 muestras. En el caso del Frigorífico Schneck se decidió topear la cantidad de muestras diarias en 44, para poder conseguir mayor variabilidad de distintos orígenes de los toros en los diferentes muestreos, y para poder procesar los cultivos sin inconvenientes en las jarras de anaerobiosis a nivel del laboratorio.

Durante la faena, se registró el ordinal de faena individual de cada toro, y con esta información se obtuvo desde el portal del SNIG (Sistema Nacional de Información Ganadera) los datos de identificación individual, raza, edad y origen. 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.

7.2 Procesamiento de las muestras para *Campylobacter fetus*

Cultivo y aislamiento microbiológico

Las muestras se sembraron en el Laboratorio de Genética de Microorganismos de la Sección Genética Evolutiva de Facultad de Ciencias dentro de las 24 horas de obtenidas en todos los casos. En dicho laboratorio se sembraron 100 µl de cada muestra en Medio Skirrow (OIE, 2017), 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 hasta que se identificó y se obtuvo el aislamiento. Las subespecies de las cepas se identificaron fenotípicamente por la prueba de tolerancia a glicina al 1% y la prueba de producción de sulfuro de hidrógeno (H₂S) en un medio con Triple Sugar Iron (TSI) (OIE, 2017). Los aislamientos obtenidos fueron congelados a menos 80°C.

Real time PCR

Se realizó la rtPCR de las muestras en 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 primers que amplifican una secuencia de 78 pb del gen 16S rRNA y una sonda TaqMan-MGB que se dirige a una región polimórfica de 19 pb que detecta cepas de *C. fetus* para diferencia de otras especies de *Campylobacter* y otras bacterias. Se realizó la extracción de ADN con un método de calor “fastboiling” rápido (Schunk et al. 1995) a partir de 1 ml de esmegma prepucial. Las muestras se agruparon en pools de a 5 muestras cada uno. La rtPCR se realizó con un volumen final de 25 µL, que contenía 1 × TaqMan Genotyping Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, EE. UU.), 1 × Custom TaqMan SNP Genotyping Assay (0,9 µM cada primer y 0,2 µM de la sonda) y 1 µL del ADN correspondiente al pool de muestras. El termociclado se realizó en un ABIPrism 7500 (Applied Biosystems). Cuando se detectaba un “pool” positivo, se repetía la rtPCR con cada muestra individual que formaba ese pool para identificar la muestra positiva.

7.3 Procesamiento y cultivo de las muestras para *Tritrichomona foetus*

Luego de descargar el esmegma prepucial en los tubos de PBS correspondientes, se obtuvo 1 ml con pipeta Pasteur descartable y se sembró en el tubo correspondiente individualmente identificado con el medio de cultivo Diamond TYM (BonDurant, 1997) para *T. foetus*. Fueron enviadas al Laboratorio de la Plataforma de Salud

Animal de INIA La Estanzuela, dentro de las 24 horas de obtenidas, en recipientes isotérmicos a temperatura ambiente. En el laboratorio se incubaron en estufa a 37°C durante 7 días. Para determinar el crecimiento y/o presencia de *Tritrichomona foetus*, diariamente se realizó la observación del cultivo correspondiente colocando una gota con ansa sobre un portaobjeto y observando al microscopio con un aumento de 100X durante 7 días, buscando la morfología y movilidad característica.

7.4 Análisis estadístico

Los cálculos epidemiológicos de sensibilidad y especificidad de la rtPCR, y el valor de concordancia *kappa* (Thrusfield, 1995) entre el cultivo y la rtPCR, se calcularon utilizando el software *Epidat 3.1*.

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

8. RESULTADOS

Se obtuvieron 315 muestras de esmegma prepucial de diferentes toros, de 62 establecimientos. De estas 315 muestras, se obtuvieron 7 cultivos y aislamientos positivos de *Campylobacter fetus*, y 308 cultivos negativos. De estos 7 aislamientos, 6 se identificaron por pruebas bioquímicas como *C. fetus venerealis* y 1 como *C. fetus fetus*. En cuanto a la rtPCR, se obtuvieron 9 reacciones positivas y 306 reacciones negativas. Las 2 muestras que dieron positivo a rtPCR pero no se obtuvo crecimiento en los medios de cultivo, fueron la R13 (n° de muestra 59) y la S4 (n° de muestra 90). Las 7 cepas de *Campylobacter fetus* aisladas son de 6 orígenes diferentes, ya que hay 2 cepas que son del mismo establecimiento. De 62 establecimientos de origen, se obtuvieron 6 positivos por cultivo y aislamiento, y 8 positivos a rtPCR. Los cultivos de *Tritrichomona foetus* fueron todos negativos.

Aislamientos por predio y características de los mismos

De los 4 establecimientos muestreados, se obtuvo un aislamiento de *C. fetus fetus* en el establecimiento H (muestra H1) y *C. fetus venerealis* en el establecimiento U (muestra U10), mientras que en los establecimientos M y S no se obtuvo ningún aislamiento. En cuanto a los resultados de la rtPCR, se obtuvieron las mismas muestras positivas que los cultivos en los establecimientos H y U, mientras que la muestra S4 del establecimiento S fue positiva a rtPCR, a pesar de que no se obtuvo el cultivo positivo (Cuadro IV).

Cuadro IV. Resultados de las muestras de esmegma prepucial obtenidos de los establecimientos con sospecha clínica de la enfermedad.

Establecimiento	Número de muestras	Cultivo <i>Campylobacter fetus</i>	rt PCR <i>Campylobacter fetus</i>	Cultivo <i>Tritrichomona foetus</i>
H	2	H1: POSITIVO	H1: POSITIVO	Negativo
M	15	negativo	negativo	Negativo
S	25	negativo	S4: POSITIVO	Negativo
U	28	U10: POSITIVO	U10: POSITIVO	Negativo

*rtPCR: real time Polymerase Chain Reaction.

H1, S4 y U10: códigos correspondientes a las muestras obtenidas.

Establecimiento H

El establecimiento H era un predio lechero, con 43 vacas en ordeño, 10 vacas secas, y 2 toros con servicios todo el año. Los primeros síntomas que se observaron fue una baja en el número de partos, a lo que se agregó 3 abortos en el último tercio de la gestación, estimando un 30% aproximadamente de pérdidas reproductivas. Frente a esta situación, se concurrió al establecimiento para realizar el examen de aptitud clínica reproductiva y se obtuvieron muestras de esmegma prepucial de los 2 toros H1 y H2. En la muestra del toro H1 se obtuvo cultivo y aislamiento de *C. fetus* positivo y rtPCR positivo.

Establecimiento M

El establecimiento M era un predio lechero, con 600 vacas en ordeño. El predio contaba con antecedentes de la presencia de CGB con diagnóstico positivo por cultivo obtenido a partir de muestras de mucus vaginal de vacas abortadas. Los servicios se realizaban con inseminación artificial desde mayo a noviembre, y repaso con toro desde noviembre a diciembre. Se registraron pérdidas de porcentaje de

preñez de un 10%, más 2% de abortos a término, estimando un 12% total de pérdidas reproductivas. Se realizó el raspaje prepucial de 15 toros utilizados en el servicio, pero no se obtuvo aislamiento positivo.

Establecimiento S

El establecimiento S era un predio ganadero donde se realizaba cría vacuna, con 25 toros y 450 vacas de cría. Luego del diagnóstico de gestación realizado en mayo de 2018, se observó un porcentaje de preñez del 40%, muy bajo comparado al 70% de promedio de años anteriores, y aplicando siempre las mismas medidas de manejo. Frente a la sospecha de la enfermedad, se concurrió al establecimiento para tomar muestras de esmegma prepucial de los 25 toros utilizados. De estas muestras no se obtuvo ningún aislamiento, pero la muestra S4 fue positiva a rtPCR.

Establecimiento U

El establecimiento U era un predio ganadero donde se realizaba cría vacuna, con 55 toros y 520 vacas de cría, con servicio desde el 15 de noviembre al 15 de febrero, y antecedentes de preñez del 85% promedio de los últimos 5 años.

En el diagnóstico de gestación se obtuvo 68% de preñez en un lote de vacas, más 4 o 5 abortos que se observaron a campo, estimando un 20% de pérdidas reproductivas. Dada la sospecha clínica de la enfermedad, el veterinario del establecimiento realizó el examen de aptitud clínica reproductiva de los 55 toros utilizados en el servicio, incluyendo el raspaje prepucial para descartar enfermedades venéreas, y se obtuvieron 12 toros positivos por PCR en un laboratorio privado.

Con este resultado, se concurrió al establecimiento para obtener muestras de esmegma prepucial para cultivo bacteriológico y poder confirmar el diagnóstico. Se realizó el raspaje de 28 toros, y en la muestra del toro U10 se obtuvo cultivo y aislamiento de *C. fetus* positivo y rtPCR positivo.

Estimación de la sensibilidad y especificidad de la rtPCR y valor kappa

Para la estimación de la sensibilidad y especificidad de la rtPCR, se tomó como referencia de “animales enfermos” a los positivos por cultivo y aislamiento, obteniendo una sensibilidad del 100% (entre 92,9% y 100%). A su vez, se tomaron como referencia de “animales sanos” a los negativos por cultivo y aislamiento, obteniendo una especificidad del 99,4% (entre 98,3% y 100%) con un intervalo de confianza del 95% (Cuadro V).

Cuadro V. Sensibilidad y especificidad de la real time PCR.

		cultivo		
		enfermo	sano	
rtPCR	positivo	7	2	9
	negativo	0	306	306
		7	308	315

El valor de concordancia kappa obtenido al comparar ambas técnicas diagnósticas fue de 0,87 con un error estándar de 0,09 y un intervalo de confianza de 95%.

Estimación de la prevalencia

Se obtuvo una prevalencia estimada por toro de *C. fetus* de 2,2 % por cultivo y aislamiento, y de 2,9% por rtPCR, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los dos resultados, con un intervalo de confianza del 95%. (Cuadro VI).

Cuadro VI. Estimación de la **prevalencia individual** por cultivo y por real time PCR, a partir de 315 muestras, 7 aislamientos positivos, y 9 positivos a real time PCR, con un intervalo de confianza del 95%.

Por técnica	% límite inferior	% de prevalencia estimada	% límite superior
Prevalencia por cultivo	1,1%	2,2%	4,5%
Prevalencia por rtPCR	1,5%	2,9%	5,3%

También se obtuvo una prevalencia estimada por establecimiento de *C. fetus* de 9,7% por cultivo y aislamiento, y del 12,9% por rtPCR, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los dos resultados, con un intervalo de confianza del 95% (Cuadro VII).

Cuadro VII. Estimación de la **prevalencia por establecimiento** por cultivo y por real time PCR, a partir de una muestra de 62 establecimientos diferentes, con un intervalo de confianza del 95%.

Por establecimiento	% límite inferior	% de prevalencia estimada	% límite superior
Prevalencia por cultivo	4,5%	9,7%	19,5%
Prevalencia por rtPCR	6,7%	12,9%	23,4%

Se obtuvieron muestras de 12 departamentos diferentes del país, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los positivos según departamento de origen, con un intervalo de confianza del 95%, obteniendo cepas de 5 departamentos diferentes (Cuadro VIII).

Cuadro VIII. Resultados de muestras positivas por cultivo y por real time PCR según departamento de origen de la muestra.

Departamento	Total	Cultivo		rtPCR	
		negativo	POSITIVO	negativo	POSITIVO
Artigas	37	36	1	36	1
Canelones	60	60		59	1*
Cerro Largo	35	32	3	32	3
Colonia	2	2		2	
Flores	7	7		7	
Florida	22	21	1	21	1
Paysandú	74	73	1	72	2*
Río Negro	10	9	1	9	1
Rocha	4	4		4	
Salto	20	20		20	
San José	33	33		33	
Treinta y Tres	11	11		11	
Total	315	308	7	306	9

* Muestras positivas a real time PCR y negativas a cultivo.

Se obtuvieron muestras de toros desde 2 a 12 años de edad, que se agruparon en toros menores o igual a 3 años, y toros mayores a 3 años (Wagner et al. 1965; Philpott 1968; Ladds et al. 1973), sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, con un intervalo de confianza del 95% (Cuadro IX).

Cuadro IX. Estimación de la **prevalencia por edad** de la muestra, para los grupos menores o igual a 3 años, o mayores a 3 años, con un intervalo de confianza del 95%.

Por edad	% límite inferior	% de prevalencia estimada	% límite superior
menor o igual a 3 años	0,5%	1,8%	6,2%
mayores de 3 años	1,6%	3,6%	8,2%

Se obtuvieron muestras de toros de 25 razas y cruzas diferentes, que se agruparon en raza Hereford, Aberdeen Angus, Holando, y “Cruzas y otras” (razas sintéticas y varias), sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, con un intervalo de confianza del 95% (Cuadro X).

Cuadro X. Estimación del intervalo de la **prevalencia por raza** de la muestra, con un intervalo de confianza del 95%.

Por raza	% límite inferior	% de prevalencia estimada	% límite superior
Hereford	0%	0%	3,56%
Aberdeen Angus	0,6%	2,0%	7,0%
Holando	0,3%	1,7%	9,1%
Cruzas y otras	2,97%	7,5%	17,9%

Los cultivos correspondientes a *Tritrichomona foetus* dieron todos negativos, luego de la observación diaria de los medios de cultivo durante 7 días.

9. DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo confirman la hipótesis planteada de que *Campylobacter fetus* se encuentra presente en muestras de esmegma prepucial de toros de descarte y de establecimientos con sospecha de la enfermedad. Esta información 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 de forma estimada la presencia y prevalencia de *C. fetus*, sería útil poder realizar un muestreo con mayor cantidad de muestras en todo el país, que sea representativa 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 prevalencia individual estimada de *Campylobacter fetus* son muy similares a los obtenidos 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 desde hace 13 años. En cuanto a la prevalencia estimada de 9,7% por establecimiento, se observa una diferencia con respecto al 20,5% reportado por Repiso et al. (2005) estimado sobre la base de 47 aislamientos positivos. No se correlacionó directamente el aislamiento positivo con las pérdidas reproductivas de cada establecimiento, debido a que estas pérdidas son multifactoriales. Tampoco hemos encontrado estudios donde se relacione la presencia del agente etiológico con el porcentaje de pérdidas reproductivas, ya que clínicamente es muy variable y depende de otros factores de manejo y prevención que se realicen en el establecimiento. 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. En cuanto al análisis de la prevalencia por raza, los resultados muestran que no hay diferencias entre razas carniceras y lecheras.

Por otra parte, no se encontró prevalencia de *Tritrichomna foetus* en las muestras analizadas. Si bien esta enfermedad fue diagnosticada en la década de los 70 en nuestro país, principalmente en ganado lechero, existen muy pocos diagnósticos desde la década del 80 hasta nuestros días (Repiso et al. 2005). A pesar de las medidas de manejo aplicadas para evitar la TGB, parece difícil de explicar por qué existe tan baja o nula prevalencia en nuestro país, ya que la TGB es endémica en otras zonas similares epidemiológicamente como La Pampa Argentina, con manejo extensivo y monta natural. A nivel mundial, se ha descrito una prevalencia por establecimiento del 30,4% en Florida (USA) o del 18,4% y 28%, en Costa Rica y Argentina, respectivamente (Rojo Montejo et al. 2014).

La comparación de la rtPCR, 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 rtPCR realizada directamente a partir de muestras de esmegma prepucial. Iraola et al. (2016) desarrollaron en nuestro país una rtPCR 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. Estos resultados y los encontrados en nuestro trabajo son mejores que los presentados por

García Guerra et al. (2014) correspondiente al 85,4% de sensibilidad y 85% de especificidad, pero realizado directamente a partir de muestras de campo, y para detectar subespecie *C. fetus venerealis* (Hum et al. 1997; Chaban et al. 2012).

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 genómicos. 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. Los trabajos de investigación que se hicieron comparando los medios de transporte y enriquecimiento no han dado resultados repetitivos, y no hay un consenso sobre cuál es más útil, ni cuál es la mejor combinación entre los medios de transporte a utilizar y su protocolo de procesamiento (Newsam, 1960; Clark et al. 1969; Dufty & McEntee, 1969; Andrews et al. 1974; Hum et al. 1994). De todas maneras, la recomendación más extendida como medio de cultivo selectivo para *Campylobacter fetus* es el uso del medio de cultivo Skirrow (OIE, 2017). 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. A esto se agrega que la identificación de *C. fetus* a nivel de subespecie es compleja, ya que puede haber más de una subespecie al mismo tiempo en la muestra. Las más comunes son: *Cfv*, *Cff*, *C. jejuni* y *C. bubulus* (Samuelson et al. 1966; McFadden et al. 2004). Al parecer, *Cfv* comparte una estrecha relación genómica con *Cff* (Harvey & Greenwood, 1983; Roop et al. 1984). Estas dos subespecies tienen muchas características en común tanto a nivel genómico como fenotípico (Van der Graaf et al. 2013), y por lo tanto se plantea la interrogante de si es realmente necesario que una técnica de diagnóstico pueda diferenciar entre subespecies *Cfv* y *Cff*. Se debería seguir investigando a nivel genómico y molecular para poder aclarar este punto.

En este trabajo se obtuvieron 7 aislamientos nacionales que serán útiles para estudios genómicos posteriores y poder seguir avanzando en el conocimiento microbiológico de este agente. Estos aislamientos se podrían también utilizar en estudios con el objetivo de compararlos con las cepas utilizadas en las vacunas en plaza, de las cuales existe cierta evidencia empírica de que funcionan correctamente, pero no hay información científica nacional al respecto. Se podría continuar esta línea en investigaciones posteriores.

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 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*. La PCR múltiple desarrollada por Hum et al. (1997) fue la primera técnica de PCR que aparentemente fue capaz de diferenciar entre cepas de

Cfv y Cff, y representó un avance para la PCR como una técnica rápida y precisa para la detección de ADN específico de especie. Pero los autores encontraron solo el 80,8% de coincidencia entre la PCR y la caracterización bioquímica de las cepas utilizadas. Le atribuyeron estas diferencias a la falta de una adecuada estandarización de las pruebas bioquímicas.

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). Por otro lado, una de las desventajas de la muestra de esmegma prepucial que se obtiene del toro es la baja concentración de posibles *C. fetus* presentes. Pannachio et al. (1993) intentaron resolver este problema a través de la extracción de ADN con fenol/cloroformo para eliminar proteínas y contaminantes, seguido de la precipitación de ADN con etanol. El pre-tratamiento fue necesario para eliminar otras bacterias y compuestos químicos, lo que podría inhibir la reacción de PCR. La precipitación de ADN fue necesaria para concentrar el ADN presente en la muestra tratada, para facilitar la detección en el caso de que haya pocas bacterias Cfv en la muestra. Al concentrar las bacterias de Cfv en muestras de esmegma prepucial, se mejoraron las posibilidades de recuperación (Clark, 1971; Pannachio et al. 1993). El tratamiento de las muestras mediante filtración y centrifugación, aumenta significativamente el porcentaje de resultados positivos, y por lo tanto es importante realizar ese tratamiento antes de realizar la PCR (Pannachio et al. 1993, Hum et al. 1997).

Las 2 muestras R13 y S4 que dieron positivo a rtPCR, y en las cuales no se obtuvo crecimiento en los medios de cultivo, parece correcto considerarlas como verdaderas positivas a rtPCR y falsas negativas en los cultivos, considerando la sensibilidad del 100% y especificidad de 99,4% de la rtPCR usada en nuestro trabajo, y también en base a la información generada por Iraola et al. (2016). A su vez, la baja sensibilidad que tiene el cultivo de entre 32,7 y 60% (Dutra 2013, García Guerra et al. 2014) nos lleva a discutir que la misma muestra que fue negativa al cultivo pero positiva a una rtPCR con una sensibilidad estimada del 100%, tiene mayor probabilidad de ser falsa negativa al cultivo y verdadero positivo por la rtPCR. A su vez, el valor de concordancia *kappa* de 0,87 entre el cultivo y la rtPCR 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).

La posibilidad de diagnosticar muestras de forma rápida, sensible y reproducible hace que este protocolo de rtPCR sea una buena opción para la identificación y cuantificación molecular de especies de *C. fetus*. El protocolo descrito por Iraola et al. (2016) es una técnica precisa y rápida, sensible y específica. Utilizar esta rtPCR 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 rtPCR, 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 agente aunque se encuentre en muy bajas concentraciones. En una enfermedad como la CGB, donde no se puede predecir el número de bacterias viables obtenidas en la muestra de esmegma prepucial, y donde es difícil la adecuada identificación del microorganismo, poder confiar en una técnica de PCR es una ventaja para el futuro del diagnóstico. Además, la sensibilidad y especificidad de esta rtPCR 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.

Es importante diferenciar entre la detección de *C. fetus* en un análisis de laboratorio, y el diagnóstico clínico de la enfermedad CGB según la definición utilizada (OIE 2017). 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. No es suficiente un resultado de laboratorio para establecer correctamente el diagnóstico, en parte porque esos resultados pueden ser falsos o verdaderos según la sensibilidad y especificidad de la técnica utilizada. Este trabajo tuvo como uno de los objetivos poder desarrollar y poner a punto una metodología de laboratorio para la correcta detección de *C. fetus*, pero en los muestreos de establecimientos con sospecha de la enfermedad se intentó relacionar la información de los antecedentes y la posible sintomatología clínica presente, con la estimación del porcentaje de pérdidas reproductivas en cada caso. El porcentaje de pérdidas reproductivas estimado en este trabajo fue muy variable, desde un 12% a un 30%, siendo superiores a los datos publicados de 7,9 % (de Nava, 2011) y 10,3% (Bidondo et al. 2010).

En el caso de que las muestras de esmegma prepucial sean positivas a la detección de *C. fetus*, se podría optar por descartar ese toro, o eventualmente optar por realizar un tratamiento. Los estudios mencionados sobre los tratamientos de toros utilizando clorhidrato de dimetridazole (Campero et al. 1987), metanosulfonato de dimetridazole (Stoessel y Haberkorn, 1977; Palladino et al. 1983), estreptomycin (Campero et al. 1993; Tuyers et al. 2014), oxitetraciclina (von Bispin et al. 1981; Campero et al. 1993; Cipolla et al. 2000), han obtenido resultados eficaces de entre 95% y 100%. Abril et al. (2010) encontraron cepas de Cff con genes de resistencia para tetraciclina y estreptomycin, también presentes en Cfv, lo que hace que disminuyan las alternativas de tratamiento. Partiendo de esta información, se realizó un experimento en paralelo a esta tesis, donde se evaluó un tratamiento sistémico con oxitetraciclina y un tratamiento local con rifaximina, con resultados de 83% y 50% de eficacia respectivamente (Delpiazzi et al. 2018). No hay previamente información disponible sobre el tratamiento local con rifaximina para CGB, pero la eficacia del 50% obtenida genera un antecedente importante.

10. CONCLUSIONES

- *Campylobacter fetus* sigue estando presente en nuestro país, en establecimientos de diferentes regiones.
- La rtPCR utilizada (Iraola et al. 2016) es una técnica adecuada para la detección de *C. fetus* directamente a partir de muestras de esmegma prepucial, ya que presenta un elevado valor de concordancia *kappa* (0,87), pudiendo ser utilizada como técnica de screening previo a realizar el cultivo.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abril C, Vilei EM, Brodard I, Burnens A, Frey J, Miserez R. (2007). Discovery of Insertion Element *ISCfe1*: A new tool for *Campylobacter fetus* subspecies differentiation. Clin. Microbiol. Infect., 13, 993–1000.
2. Abril C, Brodard I, Perreten V. (2010). Two novel antibiotic resistance genes, tet(44) and ant(6)-Ib, are located within a transferable pathogenicity island in *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*. Antimicrob Agents Chemother. 54(7):3052–5.
3. Baltzell P, Newton H, O'Connor AM. (2013). A critical review and metaanalysis of the efficacy of whole-cell killed *Trichostrongylus axei* vaccines in beef cattle. J Vet Intern Med; 27:760–70.
4. Benquet Sansone N. (2005). Diagnosis of bovine venereal campylobacteriosis in New Zealand. Master of Applied Science, Massey University, Palmerston North, New Zealand.
5. Berg & Firehammer. (1971). A revised classification of *Vibrio fetus*. American Journal of Veterinary Research, 32, 11-22.
6. Bergey DH, Holt, JG. (1993). Group 2: Aerobic/microaerophilic, motile, helical/vibrioid gram-negative bacteria, In: Holt, J.G., Hensyl, W.R., Forlifer, L.E. (Eds.) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore.
7. Bidondo A, Blanc J, Moraes J. (2010). Pérdidas reproductivas desde el servicio al destete en la región litoral oeste del Uruguay. XXXVIII Jornadas Uruguayas de Buiatría: 104-105.
8. Bier P.J., Hall C.E., Duncan J.R., Winter A.J. (1977). Experimental Infections with *Campylobacter-Fetus* in Bulls of Different Ages. Vet. Microbiol. 2, 13-27.
9. Blom K, Patton CM, Nicholson M.A., Swaminathan B. (1995). Identification of *Campylobacter-Fetus* by Pcr-DNA Probe Method. J. Clin. Microbiol. 33, 1360-1362.
10. Bolton FJ, Holt AV, Hutchinso, DN. (1983). Medium for Isolating *Campylobacter-Fetus*. Vet. Rec. 113, 356-356.
11. Bondurant RH. (1997). Pathogenesis, diagnosis and management of trichomoniasis in cattle. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract., 13, 345–361.
12. Boomsma A. (2005). Confidence Intervals for a Binomial Proportion. Department of Statistics & Measurement Theory. University of Groningen.
13. Border M, Firehammer B. (1980). Antigens of *Campylobacter fetus* subsp *fetus* eliciting vaccinal immunity in heifers. SO - American Journal of Veterinary Research. 41, 746-750.
14. Bouters R, De Keyser J, Vandeplassche M, Van Aert A, Brone E, Bonte P. (1973). *Vibrio fetus* infection in bulls: curative and preventive vaccination. Br Vet J; 129 (1):52-7
15. Bryan L.A., Cambell J.R., Gajadhar A.A. (1999). Effects of temperature on the survival of *Trichostrongylus axei* in transport, Diamond's and InPouch™ TF media. Vet. Rec., 144, 227–232.
16. Campero CM, Ballabene NC, Cipolla AC, Zamora AS. (1987). Dual infection of bulls with campylobacteriosis and trichomoniasis: treatment with dimetridazole chlorhydrate. Aust.Vet. J. 64: 320-321.
17. Campero CM, Cipolla AL, Odriozola E, Medina D, Morsella CG, Saubidet M. (1993). Tratamientos sistémicos en toros con infección genital a

- Campylobacter fetus* subsp. *fetus*. Vet. Arg. 10: 303-309
18. Campero CM, Moore DP, Odeon AC, Cipolla AL, Odriozola E. (2003). Aetiology of bovine abortion in Argentina. Vet Res Commun 27: 359-369.
 19. Campero CM, Morrell E, Morsella C, Paolicchi F, Cano D, Lazaro L. (2010). Detección de anticuerpos séricos en toros inmunizados contra campylobacteriosis. Rev. vet. 21: 1, 8–12.
 20. Carrol EJ, Hoerlein AB. (1972). Diagnosis and Control of Bovine Genital Vibriosis. Journal of the American Veterinary Medical Association. 161, 1359-1364.
 21. Castles I. (1998). The mismeasure of nations: A review essay on the *Human Development Report 1998*. Population and Development Review; 24 (4).
 22. Chaban B, Chu S, Hendrick S, Waldner C, Hill JE. (2012). Evaluation of a *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* real-time quantitative polymerase chain reaction for direct analysis of bovine preputial samples. Can J Vet Res. 76(3), 166–73.
 23. Cipolla A, Casaro AP, Terzolo HR, Estela ES, Brooks BW, Garcia MM. (1994). Persistence of *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* in Experimentally Infected Heifers. Vet. Rec. 134, 628-628.
 24. Cipolla A., Odriozola E., Morsella C. (2000). Use of Oxytetracycline in bulls naturally infected with *Campylobacter fetus* subsp. XXI Congreso Mundial de Buiatria, Punta del Este, Uruguay.
 25. Clark BL, Dufty JH, Monsborough MJ. (1968). Vaccination of bulls against bovine vibriosis. Aust Vet J 44:530.
 26. Clark B.L., Dufty J.H., Monsborough M.J. (1969). Observations on the isolations of *Vibrio fetus* (*venerealis*) from the vaginal mucus of experimentally infected heifers. Aust. Vet. J. 45, 209-212.
 27. Clark BL. (1971). Review of Bovine Vibriosis. Aust. Vet. J. 47, 103-107.
 28. Clark B.L., Monsborough M.J., Dufty J.H. (1974a). Letter: Isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* and *Campylobacter fetus* subsp. *intermedius* from the preputial secretions of bulls. SO - Australian Veterinary Journal. 50, 324.
 29. Clark BL, Dufty JH, Monsborough MJ, Parsonson IM. (1974b). Immunisation against bovine vibriosis. Vaccination of bulls against infection with *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. Aust Vet J; 50:407–9.
 30. Clark BL, Dufty JH, Monsborough MJ, Parsonson IM. (1977). A dual vaccine for the immunisation of cattle against vibriosis. SO - Australian Veterinary Journal. 53, 465-466.
 31. Clark BL & Dufty JH. (1978). Isolation of *Campylobacter fetus* from bulls. Aust. Vet. J., 54, 262–263.
 32. Clark BL, Dufty JH, Monsborough MJ, Parsonson IM. (1979). A dual vaccine for immunisation of bulls against vibriosis. Aust Vet J;55:43.
 33. Clark BL, Dufty JH, Parsonson IM. (1983). Immunisation of bulls against trichomoniasis. Aust Vet J;60:178–9.
 34. Clark BL, Emery DL, Dufty JH. (1984). Therapeutic immunisation of bulls with the membranes and glycoproteins of *Tritrichomonas foetus* var. *brisbane*. Aust Vet J;61:65-6.
 35. Cobo ER, Cipolla A, Morsella C, Cano D, Campero C. (2003). Effect of two commercial vaccines to *Campylobacter fetus* subspecies on heifers naturally challenged. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 50: 75-80.

36. Cobo ER, Favetto PH, Lane V., Friend A, Van Hooser K, Mitchell J, Bon Durant RH. (2007). Sensitivity and specificity of culture and PCR of smegma samples of bulls experimentally infected with *Tritrichomonas foetus*. *Theriogen.*, 68, 853–860.
37. Corbeil LB, Schurig GD, Duncan JR, Corbeil RR, Winter AJ. (1974) Immunoglobulin classes and biological functions of *Campylobacter* (*Vibrio*) *fetus* antibodies in serum and cervicovaginal mucus. *Infect Immun*; 10:422–9.
38. Corbeil LB, Schurig GG, Duncan JR, Wilkie BN, Winter AJ. (1981) Immunity in the female bovine reproductive tract based on the response to “*Campylobacter fetus*”. *Adv Exp Med Biol* 1981;137:729–43.
39. Corbeil LB. (1999). Immunization and diagnosis in bovine reproductive tract infections. *Adv Veter Med AP*. 41: 217-239.
40. Corbeil LB, Campero CM, Rhyhan JC, Bondurant RH. (2003). Vaccines against sexually transmitted diseases. *Reprod Biol Endocrinol* 1: 118-123.
41. De Nava G. (2011). Reproducción en los rodeos de cría pastoriles: el enfoque de un veterinario de campo. XXIX Jornadas Uruguayas de Buiatría: 68-77.
42. Dekeyser J. (1984). *Campylobacter* infection in man and animals. En JP Butzler (ed.). CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
43. Delpiazzo R, Álvarez V, Barcellos M, Calleros L. (2018). Evaluación a campo del tratamiento sistémico o tópico de toros positivos a *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. XLVI Jornadas Uruguayas de Buiatría: 159-162.
44. Drancourt M, Bollet C, Calioz A, Martelin R, Gayral J, Raoul D. (2000). 16S Ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3623-3630.
45. Dufty J.H., McEntee K. (1969). Evaluation of some culture media and sampling techniques for the diagnosis of Vibriosis in the bull. *Aust. Vet. J.* 45, 140-144.
46. Dufty JH, Clark B.L., Monsborough M.J. (1975). The Influence of Age on the Susceptibility of Bulls to *Campylobacter-Fetus* Subsp *Venerealis*. *Aust. Vet. J.* 51, 294-297.
47. Dutra F. (2013). Serie Técnica INIA n° 208. Seminario de Actualización Técnica: Cría Vacuna. Editoras: Graciela Quintans, Antonia Scarsi, pp: 15-26.
48. Eaglesome MD, García M.M., Hawkins C.F., Alexander F.C. (1986). Vaccination studies for the control of campylobacteriosis in Jamaican cattle. *Veterinary Record*. 119, 299-301.
49. Eaglesome MD & García M. (1997). Disease risks to animal health from artificial insemination with bovine semen. *Rev. sci tech. Off int. Epiz.* 16:215-225.
50. Easton C. (2006). Estudio patológico de las principales causas infecciosas en el aborto bovino en Uruguay, identificación de la acción de agentes infecciosos vinculados con el aborto bovino. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Veterinaria. Programa de Posgrados. Maestría en Salud Animal.
51. Errico, F, De Freitas A, Barriola J. (1976). Tipificación, distribución y síndrome asociado con el aislamiento de cepas de *Campylobacter Fetus* de bovinos del Uruguay. *Gaceta Veterinaria*. pp 232-237.
52. Felleisen R. (1997). Comparative sequence analysis of 5.8S rRNA genes and internal transcribed spacer (ITS) regions of trichomonadid protozoa. *Parasitol.*, 115, 111–119.
53. Ferreira Figueredo J, Oliveira Pellegrin A, Bastos Foscolo C, Machado RP, Pereira Lage A. (2002). Evaluation of direct fluorescent antibody test for the

- diagnosis of bovine genital campylobacteriosis. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 44, 118-123.
54. Fitzgerald PR. (1986). Bovine trichomoniasis in parasites: epidemiology and control. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.*, 2, 277–282.
 55. García Guerra A, Chaban B, Colina JE, Waldner CL, Hendrick SH. (2014). Clinical sensitivity and specificity of a real-time PCR assay for *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* in preputial samples from bulls. *Am J Vet Res*;75:851-60.
 56. García MM, Stewart R.B., Ruckerbauer G.M. (1984). Quantitative-Evaluation of a Transport-Enrichment Medium for *Campylobacter-Fetus*. *Vet. Rec.* 115, 434-436.
 57. Gorkiewicz G, Feierl G, Schober C, Dieber F, Köfer J, Zechner R, Zechner EL. (2003). Species-specific identification of *Campylobacters* by partial 16S rRNA gene sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2537-2546.
 58. Hartley WJ. (1952). Diagnosis and Control of *Vibrio foetus* Infections in the Bovine. *The New Zealand Veterinary Journal* 1, 33-35.
 59. Harvey SM, Greenwood JR. (1983). Relationships among catalase-positive campylobacters determined by deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridisation. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33, 275-284.
 60. Hjerpe CA. (1990). Bovine vaccines and herd vaccination programs. *Vet. Clin. N. Am.-Food Anim. Pract.* 6, 219-222.
 61. Hum S. (1987). Bovine Abortion Due to *Campylobacter-Fetus*. *Aust. Vet. J.* 64, 319-320.
 62. Hum S, Brunner J, Gardiner B. (1993). Failure of therapeutic vaccination of a bull infected with *Campylobacter fetus*. *Aust Vet J* 70: 386-387.
 63. Hum S, Brunner J, McInnes A, Mendoza G, Stephens J. (1994). Evaluation of cultural methods and selective media for the isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* from cattle. *Aust. Vet. J.*, 71, 184-186.
 64. Hum S, Quinn K, Brunner J, On SLW. (1997). Evaluation of PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. *Aust. Vet. J.* 75:827-831.
 65. 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. <http://doi.org/10.1186/s12917-016-0913-3>.
 66. Jeffrey M, Hogg, RA. (1988). Concurrent bovine virus diarrhoea virus and *Campylobacter fetus* infection in an aborted bovine fetus. *Vet. Rec.* 122, 89-90.
 67. Jimenez DF, Perez AM, Carpenter TE, Martinez A. (2011). Factors associated with infection by *Campylobacter fetus* in beef herds in the Province of Buenos Aires, Argentina. *Prev Vet Med.* 101(3-4): 157-162.
 68. Johns DR, Mater RJ, Medveczky NE. (1977). Bovine vibriosis vaccination: immunity conferred by a single biotype. *Australian Veterinary Journal.* 53, 467-469.
 69. Kiggins EM, Plastring WM. (1956). Effect of gaseous environment on growth and catalase content of *Vibrio fetus* cultures of bovine origin. *J. Bacteriol.* 72, 397-400.
 70. Kittel DR., Campero C., Van Hoosear K.A., Rhyan J.C., Bondurant R.H. (1998). Comparison of diagnostic methods for detection of active infection

- with *Tritrichomonas foetus* in beef heifers. J. Am. Vet. Med. Assoc., 213, 519–522.
71. Ladds PW, Dennett DP, Glazebrook JS. (1973). A survey of the genitalia of bulls in Northern Australia. Australian Veterinary Journal. 49, 335-340.
 72. Lander KP. (1990a). The Development of a Transport and Enrichment Medium for *Campylobacter-Fetus*. Br. Vet. J. 146, 327-333.
 73. Lander KP. (1990b). The Application of a Transport and Enrichment Medium to the Diagnosis of *Campylobacter-Fetus* Infections in Bulls. Br. Vet. J. 146, 334-340.
 74. Lein D, Erickson I, Winter AJ, McEntee K. (1968). Diagnosis, treatment and control of vibriosis in an artificial insemination center. Journal of the American Veterinary Medical Association. 153, 1574-1580.
 75. Lorenzo MO. (1905). Methods for measuring the concentration of wealth. J Am Stat Assoc; 9.
 76. LPSN Bacterio.net (List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature) (2018). <http://www.bacterio.net/campylobacter.html> (consultado el 19-feb-2018).
 77. MacLaren APC, Agumbah GJO. (1988). Infertility in Cattle in Southwest Scotland Caused by an Intermediate Strain of *Campylobacter-Fetus*-Subspecies-*Fetus* (Formerly *Campylobacter-Fetus-Intestinalis*). Br. Vet. J. 144, 29-44.
 78. Marcellino RB, Morsella CG, Cano D, Paolicchi FA. (2015). Eficiencia del cultivo bacteriológico y de la inmunofluorescencia en la detección de *Campylobacter fetus* en fluidos genitales bovinos. Rev Argent Microbiol. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2015.03.008>
 79. Manual de Epidat 3.1. (2005). Análisis epidemiológico de datos tabulados. Xunta de Galicia, Santiago de Compostela, Coruña, España.
 80. McFadden A, Heuer C, Jackson R, West DM, Parkinson TJ. (2004). Investigation of bovine venereal campylobacteriosis in beef cow herds in New Zealand. N. Z. Vet. J. 53, 45-52.
 81. McGoldrick A, Chanter J, Gale S, Parr J, Toszeghy M, Line K. (2013). Real Time PCR to detect and differentiate *Campylobacter fetus* subspecies *fetus* and *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis*. J Microbiol Meth. 94 (3): 199–204.
 82. 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. J Clin Microbiol. 44: 938-945.
 83. Mellick P.W., Winter A.J., McEntee K. (1965). Diagnosis of Vibriosis in the bull by use of the fluorescent antibody technique. Cornell Veterinarian 55, 280-294.
 84. Michi AN, Favetto PH, Kastelic J, Cobo ER. (2016). A review of sexually transmitted bovine trichomoniasis and campylobacteriosis affecting cattle reproductive health. Theriogenology, 85, 781–791
 85. Modolo JR, Lopes CAM, Genari T. (2000). Occurrence of *Campylobacter* in the genitals of teaser bulls maintained at an embryo transfer center. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia 52.
 86. 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). Prev Vet Med. 110: 388-394.
 87. Monke HJ, Love BC, Wittum TE, Monke DR, Byrum BA. (2002). Effect of

- transport enrichment medium, transport time, and growth medium on the detection of *Campylobacter fetus* subesp *venerealis*. J. Vet. Invest., 14, 35–39.
88. 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. *Reprod Domest Anim.* 45(5): 221-230.
 89. Mukhufhi N, Irons PC, Michel A, Peta F. (2003). Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Tritrichomonas foetus* infection in bulls: effects of sample collection method, storage and transport medium on the test. *Theriogen.*, 60, 1269–1278.
 90. Muller W, Hotzel H, Schulze F. (2003). Identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies by PCR. *DTW-Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 110, 55-59.
 91. Nachamkin I. (1995). *Campylobacter* and *Arcobacter*, In: Murray, P.R., Baron, E.J., Tenover, F.C., Tenover, H., Y.R. (Eds.) *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington DC, pp. 483-491.
 92. Newell DG, Duim B, van Bergen MAP, Grogono-Thomas R, Wagenaar JA. (2000). Speciation, Subspeciation and Subtyping of *Campylobacter* spp. Associated with Bovine Infertility and Abortion. *Cattle practice* 8, 421-425.
 93. Newsam DB. (1960). Experimental vibrio fetus infection in heifers. Part 1: Infection and conception rates, and diagnosis. *Aust. Vet. J.* 36, 426-431.
 94. Newsam DB, Peterson JE. (1964). Persistence of vibrio fetus in genital tract of experimentally infected heifers. *Br. Vet. J.* 120, 223-228.
 95. OIE. (2012). Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres. Cap. 2.4.16. Tricomonosis. http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.04.16_Tricomonosis.pdf
 96. OIE. (2017). Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres. Cap. 2.4.4. Campilobacteriosis genital bovina. http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.04.04_Campilobacteriosis_genital_bovina.pdf
 97. On SL. (1996). Identification Methods for *Campylobacters*, *Helicobacters*, and Related Organisms. *Clinical Microbiology Reviews* 9, 405-422.
 98. 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. *J. Appl. Microbiol.*, 90, 285–293.
 99. Oyarzabal OA, Wesley IV, Harmon KM, Schroeder Tucker L, Barbaree JM, Lauerman LH, Backert S, Conner DE. (1997). Specific identification of *Campylobacter fetus* by PCR targeting variable regions of the 16S rDNA. *Vet. Microbiol.* 58, 61-71.
 100. Palladino MR & Campero CM. (1983). Vacunación contra vibriosis bovina en toros. Aspectos terapéuticos e inmunitarios. *Gac Vet* 45:1036-1051.
 101. Palladino MR, Campero CM, Acuña C. (1983). Acción terapéutica del metanosulfonato de dimetridazole en toros con vibriosis genital. *Gac. Vet.* 45: 1170-1173.
 102. Parker S, Campbell JR, Ribble C, Gajadhar AA. (1999). Comparison of two sampling tools for diagnosis of *Tritrichomonas foetus* in bulls and clinical interpretation of culture results. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 215, 231–235.

103. Parker S, Lun Z-R, Gajadhar A. (2001). Application of a PCR assay to enhance the detection and identification of *Tritrichomonas foetus* in cultured preputial samples. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 13, 508–513.
104. Parker S, Campbell J, Gajadhar A. (2003). Comparison of the diagnostic sensitivity of a commercially available culture kit and a diagnostic culture test using Diamond's media for diagnosing *Tritrichomonas foetus* in bulls. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 15, 460–465.
105. Parsonson IM, Clark BL, Dufty JH. (1974). The pathogenesis of *Tritrichomonas foetus* infection of the bull. *Aust. Vet. J.*, 50, 421–423.
106. Patrick ME, Gilbert MJ, Blaser MJ, Tauxe RV, Wagenaar JA, Fitzgerald C. (2013). Human Infections with New Subspecies of *Campylobacter fetus*. *Emerg Infect Dis.* 19(10): 1678–1680.
107. Peterson JE, Newsam DB. (1964). The histopathology of genital vibriosis in virgin heifers. *Br. Vet. J.* 120, 229-245.
108. Plumer GJ, Duvall WC. (1962). A preliminary report on a new technique for isolation of vibrio fetus from carrier bulls. *Cornell Veterinarian* 25, 110-122.
109. Rava Zefferino C, Ferraro Albertoni B, Lanfranco Crespo B. (2012). Serie Técnica INIA n° 198. Competitividad y transferencias en la cadena cárnica bovina en Uruguay.
110. Repiso MV, Gil A, Bañales P, D'Anatro N, Fernandez L, Guarino H, Herrera B, Nuñez A, Olivera M, Osawa T, Silva M. (2005). Prevalencia de las principales enfermedades infecciosas que afectan el comportamiento reproductivo en la ganadería de carne y caracterización de los establecimientos de cría del Uruguay. *Veterinaria.* 40: 1-28.
111. Ribeiro LMM. (1990). An efficient medium for the isolation of *Tritrichomonas foetus*. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 57, 209–210.
112. Rojo Montejo S, Sánchez Sánchez R, Ortega Mora L, Osoro Otaudi K, Collantes-Fernández E. (2014). Prevalencia de la tricomonosis bovina en las razas Asturiana de la Montaña y Asturiana de los Valles. *Tecnología Agroalimentaria. Boletín informativo del SERIDA*, n° 13. pp. 45-48
113. Roop RM, Smibert RM, Johnson JL, Krieg NR. (1984). Differential characteristics of catalase-positive campylobacters correlated with DNA homology groups. *Canadian Journal of Microbiology.* 30, 938-951.
114. Ruckerbauer GM, Malkin K, Mitchell D, Boulanger P. (1974). Vibriosis: 115 demonstration of *Vibrio fetus* and *Vibrio bubulus* organisms in preputial fluid by immunofluorescence and cultural techniques. *Canadian Journal of Comparative Medicine.* 38(3):321-7, 1974 Jul.
115. Samuelson JD, Winter AJ. (1966). Bovine vibriosis: the nature of the carrier state in the bull. *J. Infect. Dis.* 116.
116. Schonmann MJ, Bondurant RH, Gardner LA, Van Hoosear K, Baltzer W., Kachulis C. (1994). Comparison of sampling and culture methods for the diagnosis of *Tritrichomonas foetus* infection in bulls. *Vet. Rec.*, 134, 620–622.
117. 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. *J. Virol. Methods* 55, 427-433.
118. 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, 533-548.

119. Schurig G, Hall CE, Corbell LB, Duncan JR, Winter AJ. (1975). Bovine venereal vibriosis: cure of genital infection in females by systemic immunization. *Infection & Immunity*. 11, 245-251.
120. Sebald M, & Véron M. (1963). Teneur en bases de l'ADN et classification des vibriens. *Ann. Inst. Pasteur* 105:897-910.
121. Shires GM, Kramer TT. (1974). Filtration of bovine cervicovaginal mucus for diagnosis of vibriosis, using the fluorescent antibody test. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 164, 398-401.
122. Skirrow SZ & Bondurant RH (1988). Bovine trichomoniasis. *Vet. Bull.*, 58, 591-603.
123. Smibert RM. (1984). Genus II *Campylobacter* Sebald and Véron 1963. p. 111-118. En Krieg, NR, Holt, HG (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. Williams, & Wilkins Co., Baltimore.
124. Soulsby E.J.L. (1982). *Helminths. Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals*, Seventh Edition. Balliere Tindall, London, UK, 556-561.
125. Spence RP, Bruce IR, Mcfadden AM, Hill FI, Tisdall D, Humphrey S, Van Der Graaf L, Van Bergen MA, Wagenaar JA. (2011). Cross-reaction of a *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* real-time PCR. *Vet. Rec.*, 168, 131.
126. Stalhem OHV, Gallagher JE. (1975). Effects of *Mycoplasma* Spp, *Trichomonas-Fetus*, and *Campylobacter-Fetus* on Ciliary Activity of Bovine Uterine Tube Organ-Cultures. *Am. J. Vet. Res.* 36, 1077-1080.
127. Stella F. & Canavez F. (1971) El diagnóstico de la Vibriosis genital de los bovinos en el Uruguay. V Congreso Latinoamericano de Microbiología. Punta del Este, Uruguay, pp 131.
128. Stoessel FR, Haberkorn SE. (1977). Efecto del metanosulfonato de dimetridazole inyectado por via intraruminal como tricomonocida en los toros. *Gac. Vet.* 39: 506-510.
129. Strickland LG. (2010). *Surface Architectural Anatomy of The Penile and Preputial Epithelium of Bulls*. thesis submitted to the Graduate Faculty of Auburn University in partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master of Science. Auburn, Alabama August 9, 2010.
130. Tait SE, Taylor DJ, McCandlish IAP. (1983). Medium for Isolating *Campylobacter-Fetus*. *Vet. Rec.* 113, 547-548.
131. Te Punga WA. (1958). An indirect haemagglutination test for detection of vibrio fetus antibodies. *Part 1: Development and Properties of Antigen*. *The New Zealand Veterinary Journal* 6, 157-164.
132. Te Punga WA. (1962). Vibriosis in cattle: Part 3: Studies on control by vaccination. *N. Z. Vet. J.* 10, 89-91.
133. Tedesco LF, De Freitas A, Errico F. (1976). Diagnóstico de la Vibriosis bovina en el Uruguay. *Rev. Vet. (R.O.U)*, 61:65-68.
134. Tedesco LF, Errico F, Del Baglivi PL. (1977). Comparison of three sampling methods for the diagnosis of genital vibriosis in the bull. *Aust. Vet. J.*, 53, 470-472.
135. Terzolo HR, Campero C, Catena M. (1992). Procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la Campylobacteriosis y Trichomoniasis Genital Bovina. Comisión Científica Permanente de Enfermedades Venéreas de los Bovinos de la AAVLD. CERBAS-INTA, EEA, Balcarce.
136. Thrusfield M. (1995). Diagnostic testing. En: Thrusfield M, editor. *Veterinary epidemiology*. 2th ed. Cambrigde: Blackwell Science; p. 266-85.

137. Tu ZC, Eisner W, Kreiswirth BN, Blaser MJ. (2005). Genetic divergence of *Campylobacter fetus* strains of mammal and reptile origins. J. Clin. Microbiol., 43, 3334–3340.
138. Tuyers I, Luke T, Wilson D, Sargison N. (2014). Diagnosis and management of venereal campylobacteriosis in beef cattle. BMC Veterinary Research 10:280.
139. Van Aert A, Dekeyser P, Brone E, Bouters R, Vanderplassche M. (1976). Nature of Antibodies to *Campylobacter-Fetus* in Preputial Secretions from a Vaccinated Bull. Br. Vet. J. 132, 615-620.
140. Van Bergen MAP, Dingle KE, Maiden MC, Newell DG, Van Der Graaf-Van Bloois L, Van Putten JP, Wagenaar JA. (2005a). Clonal nature of *Campylobacter fetus* as defined by multilocus sequence typing. J. Clin. Microbiol., 43, 5888–5898.
141. Van Bergen MAP, Linnane S, Van Putten JP, Wagenaar JA. (2005b). Global detection and identification of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 24, 1017-1026.
142. Van Bergen MAP, Simons G, Van Der Graaf-Van Bloois L, Van Putten JP, Rombout J, Wesley I, Wagenaar JA. (2005c). Amplified fragment length polymorphism based identification of genetic markers and novel PCR assay for differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. J. Med. Microbiol., 54, 1217–1224.
143. Van Der Graaf-Van Bloois L, Van Bergen MAP, Van Der Wal FJ, De Boer AG, Duim B, Schmidt T, Wagenaar JA. (2013). Evaluation of molecular assays for identification *Campylobacter fetus* species and subspecies and development of a C. fetus specific real-time PCR assay. J. Microbiol. Methods, 95, 93–97.
144. Vandamme P. (2000). Taxonomy of the family *Campylobacteraceae*. In: *Campylobacter*, Second Edition Nachamkin I. & Blaser M.J., eds. ASM Press, Washington DC, USA, 3–26.
145. Varga J, Fodor L, Fazekas B, Rady M, Hajtos I. (1986). Biochemical and serological characterization of *Campylobacter* strains isolated from aborted bovine fetuses. Acta Veterinaria Hungarica. 34, 55-59.
146. Vargas AC, Costa MM, Vainstein MH, Kreutz LC, Neves JP. (2003). Phenotypic and molecular characterization of bovine *Campylobacter fetus* strains isolated in Brazil. Vet. Microbiol. 93, 121-132.
147. Vasquez LA, Ball L, Bennett BW, Rupp GP, Ellis R, Olson JD, Huffman MH. (1983). Bovine genital campylobacteriosis (vibriosis): vaccination of experimentally infected bulls. Am J Vet Res.; 44 (8):1553-7.
148. Von Bispin W, Kirpal G, Sonnenschein B. (1981). Die Diagnose und Bekämpfung der *Campylobacter fetus* subsp *fetus* infektion beim Besamungsbullen. Tierärztliche Umschau 36, 667-674.
149. Wagenaar JA, van Bergen MA, Newell DG, Grogono-Thomas R, Duim B. (2001). Comparative study using amplified fragment length polymorphism fingerprinting, PCR genotyping, and phenotyping to differentiate *Campylobacter fetus* strains isolated from animals. J Clin Microbiol. 39: 2283-2286.
150. Wagner WC, Dunn HO, VanVleck LD. (1965). Incidence of vibriosis in an AI stud. Cornell Veterinarian 55, 209-220.
151. Wang G, Clark CG, Taylor TM, Pucknell C, Barton C, Price L, Woodward DL, Rodgers FG. (2002). Colony multiplex PCR assay for the identification and

- differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. J. Clin. Microbiol., 40, 4744–4747.
152. Ware DA. (1980). Pathogenicity of *Campylobacter-Fetus* Subsp *Venerealis* in Causing Infertility in Cattle. Br. Vet. J. 136, 301-303.
 153. Warton A & Honigberg BM. (1979). Structure of trichomonads as revealed by scanning electron microscopy. J. Protozoot., 26, 56–62.
 154. Wesley IV, Wesley RD, Cardella M, Dewhirst FE, Paster NJ. (1991). Oligodeoxynucleotide probes for *Campylobacter fetus* and *Campylobacter hyointestinalis* based on 16S rRNA sequences. J. Clin. Microbiol. 29, 1812-1817.
 155. Willoughby K, Nettleton PF, Quirie M, Maley MA, Foster G, Toszeghy M, Newell DG. (2005). A multiplex polymerase chain reaction to detect and differentiate *Campylobacter fetus* subspecies fetus and *Campylobacter fetus* - species *venerealis*: use on UK isolates of *C. fetus* and other *Campylobacter* spp. J. Appl. Microbiol., 99, 758–766.
 156. Wilson EB. (1927). Probable inference, the law of succession, and statistical inference. Journal of the American Statistical Association. 22: 209–212.
 157. Winter AJ, Samuelson JD, Elkana M. (1967). A Comparison of Immunofluorescence and Cultural Techniques for Demonstration of *Vibrio fetus*. Journal of the American Veterinary Medical Association. 150.
 158. Yerushalmy J. (1947). Statistical problems in assessing methods of medical diagnosis, with special reference to X-ray techniques. Pub Health Rep 1947; 62: 1432-49.

ACTA DE EXAMEN

CURSO: Defensa de Tesis de Maestría

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: Montevideo, 7 de diciembre de 2018

TRIBUNAL: Dr. Andrés Gil, Dr. Gustavo Gastal, Dr. Martín Fraga

CI ESTUDIANTE	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
4.421.935-0	DELPIAZZO ANTÓN, Rafael Enrique	B B B	06

PRESENTADOS	NO PRESENTADOS	APROBADOS	APLAZADOS	INSCRIPTOS
1	0	1	0	1

TRIBUNAL

Dr. Andrés Gil (Presidente)

Dr. Gustavo Gastal

Dr. Martín Fraga

FIRMA

NOTA: Las calificaciones de aprobación de la Tesis de Maestría pueden ser:
B.B.B. - 6 , o S.S.S. - 12