



**“ESTUDIO DE LA PATOGENIA DE *CAMPYLOBACTER FETUS* EN BOVINOS Y UTILIZACIÓN DE TECNOLOGÍAS MOLECULARES PARA SU DETECCIÓN”**

**Juan Agustín García**

Trabajo de tesis para ser presentado como requisito parcial para optar por el título de  
**DOCTOR en CIENCIAS AGRARIAS**

Área Producción y Sanidad Animal

PROGRAMA DE POSGRADO DE CIENCIAS AGRARIAS

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA**

Lugar de realización: Laboratorio de Enfermedades Venéreas y Bacteriología – Grupo de Salud Animal – INTA EEA Balcarce

**Balcarce, Argentina  
Noviembre de 2022**

**“ESTUDIO DE LA PATOGENIA DE *CAMPYLOBACTER FETUS* EN BOVINOS Y  
UTILIZACIÓN DE TECNOLOGÍAS MOLECULARES PARA SU DETECCIÓN”**

**Juan Agustín García**



.....  
Director: Dr. Fernando Alberto Paolicchi



Dra. Andrea K. GIOFFRE  
Instituto de Biotecnología  
INTA

.....  
Co-Directora: Dra. Andrea Gioffre




.....  
Asesor: Dr. Germán José Cantón

**“ESTUDIO DE LA PATOGENIA DE *CAMPYLOBACTER FETUS* EN BOVINOS Y  
UTILIZACIÓN DE TECNOLOGÍAS MOLECULARES PARA SU DETECCIÓN”**

**Juan Agustín García**

**Aprobada por:**

*p/a*




Prof. Liliam TRIARTE, Mag  
Secretaría de Posgrado  
Facultad de Ciencias Agrarias  
LINACOR

---

Dra. Lucía Calleros

Evaluador

*p/a*




Prof. Liliam TRIARTE, Mag  
Secretaría de Posgrado  
Facultad de Ciencias Agrarias  
LINACOR

---

Dra. Anderlise Borsoi

Evaluador

*p/a*



Prof. Liliam TRIARTE, Mag  
Secretaría de Posgrado  
Facultad de Ciencias Agrarias  
LINACOR

---

Dr. Heriberto Fernández

Evaluador

**DEDICATORIA**

*A mis padres, hermano y Gachi.*

## AGRADECIMIENTOS

*Mi mayor agradecimiento a mis tutores Fernando y Andrea G. por su continuo apoyo y guía durante este proceso.*

*Un especial agradecimiento a Claudia y Alejandra M. del equipo "Campy", por enseñarme, tenerme paciencia y apoyarme durante todo el proceso.*

*A Jorgelina, Rosana, Paula, Laura, Andrea F., Yossef, Valeria y Alejandra V. del Laboratorio de Bacteriología del INTA EEA Balcarce por su compañía y apoyo día a día.*

*Otro especial agradecimiento a Pablo Farace y Juan Aller, quienes desinteresadamente aportaron sus ideas y tiempo en esta tesis, ayudando a mejorarla y aportando a mi formación.*

*A Martin, Diego, Walter, Abel y Cristian por acompañarme en el ensayo de campo y darme una enorme mano en los muestreos.*

*Andrea V. y Florencia del Laboratorio de Virología por su ayuda "molecular" y brindar nuevas ideas para continuar este camino.*

*A German por su revisión crítica del proyecto y la tesis.*

*Al Grupo de Sanidad Animal por acompañarme en este proceso y permitirme utilizar las instalaciones para llevar a cabo el proyecto.*

*A los residentes que desde que inicié la tesis participaron de los muestreos a campo. Especialmente a Joaquín Acuña, que me acompañó durante todo el ensayo y llevó a cabo su tesina de especialidad relacionado al proyecto.*

*A Pedro Soto y Enrique Lucchessi del Laboratorio Biológico Tandil por el aporte de insumos para llevar a cabo la tesis y brindar los protocolos utilizados en su laboratorio.*

*Finalmente, agradezco a mi novia, Gachi y a mi familia por su compañía y apoyo permanente en mis decisiones personales profesionales.*

## ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	ix
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	x
<b>RESUMEN</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xiii
<b>PUBLICACIONES</b> .....	xv
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
Generalidades.....	1
Campilobacteriosis genital bovina (CGB) .....	1
Diagnóstico de la campilobacteriosis bovina.....	3
Cultivo bacteriológico.....	3
Inmunofluorescencia directa (IFD) .....	4
Diagnóstico molecular.....	5
<b>HIPÓTESIS</b> .....	9
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	9
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	9
<b>Capítulo 1: Evaluación de la infección por <i>Campylobacter fetus</i> en un modelo experimental bovino y casos naturales de campo: utilización de técnicas diagnósticas convencionales y moleculares en secreciones genitales y tejidos fetales</b> .....	10
<b>1.1. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	10
1.1.1. Animales y grupos experimentales.....	10
1.1.2. Preparación de los inóculos para el desafío e infección experimental.....	12
1.1.3. Recolección de muestras de fluido genital, semen y sangre de hembras y machos bovinos .....	13
1.1.4. Análisis de las muestras y técnicas empleadas.....	15
1.1.4.1. Cultivo bacteriológico.....	15
1.1.4.2. Inmunofluorescencia directa (IFD) .....	16
1.1.4.3. Análisis mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR) .....	16
1.1.4.4. Detección de límites de sensibilidad y especificidad en muestras clínicas: inoculación experimental in vitro en mucus cérvico vaginal bovino. ....	18
1.1.4.5. Análisis mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa multiplex (mPCR) .....	19
1.1.5. Estudio de casos naturales de campo asociados a <i>Campylobacter fetus</i> en bovinos.....	19
1.1.6. Análisis de los datos.....	20
1.1.7. Responsabilidades éticas.....	21
<b>1.2. RESULTADOS</b> .....	22
1.2.1. Comparación de distintos métodos de extracción de ADN para detección de <i>C. fetus</i> por qPCR en mucus cérvico vaginal inoculado experimentalmente.....	22
1.2.2. Evaluación de la infección experimental de vaquillonas con <i>Campylobacter fetus</i> mediante pruebas moleculares y convencionales.....	23

1.2.3. Evaluación de toros naturalmente desafiados con <i>Campylobacter fetus</i> : detección de <i>C. fetus</i> mediante pruebas moleculares y convencionales. ....	30
1.2.4. Estudio de establecimientos bovinos con infección endémica de <i>Campylobacter fetus</i> mediante pruebas moleculares y convencionales: Análisis de muestras de fetos y mucus cérvico vaginal.....	36
<b>1.3. DISCUSIÓN</b> .....	41
1.3.1. Evaluación de la infección por <i>Campylobacter fetus</i> en vaquillonas experimentalmente infectadas, mediante pruebas moleculares y convencionales....	41
1.3.2. Evaluación de detección de <i>Campylobacter fetus</i> en toros naturalmente desafiados, mediante pruebas moleculares y convencionales.....	45
1.3.3 Estudio de establecimientos bovinos con infección endémica de <i>Campylobacter fetus</i> mediante pruebas moleculares y convencionales: Análisis de fetos y mucus cérvico vaginal.....	49
1.3.4 Aplicación de PCR multiplex para detección de <i>Campylobacter fetus</i> y diferenciación de subespecie en muestras clínicas y cepas aisladas de secreciones genitales de vaquillonas y toros y tejidos fetales de abortos por <i>C. fetus</i> . ....	52
<b>1.4. CONCLUSIÓN</b> .....	54
<b>Capítulo 2:</b> detección de <i>Campylobacter fetus</i> spp. de semen, vesículas seminales y mucosa prepuccial de toros naturalmente infectados con <i>C. fetus</i> .....	56
<b>2.1. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	56
2.1.1. Análisis de PCR tiempo final para detección de <i>C. fetus</i> de colonias	57
<b>2.2. RESULTADOS</b> .....	58
<b>2.3. DISCUSIÓN</b> .....	61
<b>2.4. CONCLUSIÓN</b> .....	63
<b>Capítulo 3:</b> Estudio del comportamiento venéreo de <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i> en modelo bovino experimental en dos ensayos.....	64
<b>3.1. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	64
3.1.1. Ensayo Cff-1.....	64
3.1.2. Ensayo Cff-2.....	65
<b>3.2. RESULTADOS</b> .....	67
3.2.1. Ensayo Cff-1.....	67
3.2.2. Ensayo Cff-2.....	68
<b>3.3. DISCUSIÓN</b> .....	69
<b>3.4. CONCLUSIÓN</b> .....	71
<b>4. CONCLUSIONES GENERALES</b> .....	72
<b>5. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	74
<b>6. APÉNDICE</b> .....	85



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Establecimientos ganaderos de cría bovina (n=7) con problemas reproductivos asociados a abortos bovinos por <i>C. fetus</i> , durante el 2018 y 2019. Se realizó extracción de mucus cérvico vaginal (MCV) de hembras bovinas abortadas y recolección de fetos abortados.....	20
<b>Tabla 2.</b> Resultados positivos mediante qPCR de MCV inoculado <i>in vitro</i> con diluciones seriadas de $10^8$ a $10^2$ de <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> , con 3 formas de acción previa y 2 métodos de extracción de ADN.....	22
<b>Tabla 3.</b> Resultados positivos obtenidos mediante cultivo bacteriológico (n=240), IFD (n=216) y qPCR con extracción de ADN con kit (n=216) y con método In-house (n=96) a partir de muestras de mucus cérvico-vaginal de 24 vaquillonas experimentalmente infectadas con distintas cepas (Cff, Cfv y Cfvi) (8 por grupo). .....	26
<b>Tabla 4.</b> Resultados obtenidos de qPCR para gen endógeno (GAPDH) a partir de muestras de mucus cérvico vaginal de vaquillonas experimentalmente infectadas con distintas cepas (Cff, Cfv y Cfvi) y comparación con qPCR para detección de <i>C. fetus</i> .....	27
<b>Tabla 5.</b> Resultados de mPCR para discriminación de subespecie de <i>C. fetus</i> de 17 muestras clínicas de MCV y 9 colonias aisladas de vaquillonas experimentalmente infectados con Cff, Cfv y Cfvi, respectivamente.....	29
<b>Tabla 6.</b> Resultados positivos de cultivo bacteriológico e IFD de 27 muestras de esmegma prepucial de 3 toros (Cff, Cfv y Cfvi). .....	33
<b>Tabla 7.</b> Resultados de PCR multiplex para la detección y tipificación de <i>C. fetus</i> en 12 muestras clínicas de esmegma prepucial y 9 colonias aisladas de toros naturalmente infectados.....	35
<b>Tabla 8.</b> Establecimientos ganaderos (n=7) con problemas reproductivos asociados a abortos bovinos por <i>C. fetus</i> , durante el 2018 y 2019.....	37
<b>Tabla 9.</b> Resultados de detección de <i>Campylobacter fetus</i> de pulmón y líquido de abomaso de 10 fetos bovinos abortados por <i>C. fetus</i> mediante mPCR, cultivo e IFD.....	41
<b>Tabla 10.</b> Resultados de cultivo bacteriológico e IFD para detección de <i>C. fetus</i> de muestras de semen de tres toros naturalmente desafiados con <i>C. fetus</i> (CFF, CFV y Cfvi).....	58
<b>Tabla 11.</b> Resultados de cultivo bacteriológico e IFD para detección de <i>C. fetus</i> de muestras de esmegma prepucial de un toro y mucus cérvico vaginal de seis vaquillonas experimentalmente infectadas con Cff y cuatro vaquillonas del grupo control.....	68
<b>Tabla 12.</b> Resultados de cultivo bacteriológico e IFD para detección de <i>C. fetus</i> de muestras de EP.....	68
<b>Tabla complementaria 1.</b> Resultados positivos obtenidos mediante cultivo bacteriológico (n=240), IFD (n=216) y qPCR con extracción de ADN con kit (n=216) y con método In-house (n=96) a partir de muestras de mucus cérvico-vaginal de 24 vaquillonas experimentalmente infectadas con distintas cepas (Cff, Cfv y Cfvi) (8 por grupo). .....	85

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Selección de vaquillonas Aberdeen Angus para el ensayo de infección experimental de <i>C. fetus</i> en la Reserva Ganadera número 5 (INTA EEA Balcarce).....	10
<b>Figura 2.</b> Esquema representativo del procedimiento experimental. Tres grupos de vaquillonas (n=8 por grupo). Fueron experimentalmente desafiadas con una cepa de <i>C. fetus</i> subesp. <i>venerealis</i> , <i>C.fetus</i> subsp <i>venerealis</i> biovar intermedius y <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> respectivamente y mantenidas en un potrero con un toro por 39 días. Se detallan los tiempos de muestreo de mucus cérvico vaginal (MCV), esmegma prepucial (EP) y sangre. Vaquillonas negras: no infectadas con <i>C. fetus</i> ; vaquillonas naranjas: vaquillonas experimentalmente desafiadas con la cepa de <i>C. fetus</i> respectiva.....	12
<b>Figura 3.</b> Muestreo de mucus cérvico vaginal de vaquillonas mediante aspiración con pipeta de Cassou.....	14
<b>Figura 4.</b> Muestreo de esmegma prepucial de toro con el método de aspiración con pipeta de Cassou.....	14
<b>Figura 5.</b> Esquema representativo de sembrado de muestras de MCV en placa para cultivo y pruebas bioquímicas a partir de colonias compatibles con <i>Campylobacter</i> para confirmar especie <i>C. fetus</i> (Kligler) y diferenciar subespecie (glicina, cisteína, ClNa, selenito de Na). Nota: La incubación se realizó a 37°C bajo condiciones de microaerofilia.....	15
<b>Figura 6.</b> Muestras de MCV de tres vaquillonas experimentalmente infectadas, en agar Skirrow tras 48h de incubación en atmósfera microaerófila, con colonias compatibles con <i>C. fetus</i> . Notar coloración rojiza del material sembrado.....	24
<b>Figura 7.</b> Esquema representativo de la dinámica de infección de <i>C. fetus</i> en cultivo bacteriológico apartir de mucus cérvico vaginal de 24 vaquillonas experimentalmente infectadas con distintas cepas (Cff, Cfv y Cfvi; 8 por grupo). .....	24
<b>Figura 8.</b> PCR multiplex para detección de <i>C. fetus</i> y diferenciación de subespecie de muestras de mucus cérvico vaginal (MCV). Electroforesis representativa en gel de agarosa al 1%. Pocillo 1: control positivo Cff, pocillo 2: control positivo Cfv, pocillo 3: MCV 7 día 114, pocillo 4: MCV 7 día 14, pocillo 5: MCV 3 día 14, pocillo 6: MCV 8 día 14, pocillo 7: MCV 2 día 14, pocillo 8: MCV 3 día 61, pocillo 9: MCV 5 día 14, pocillo 10: control negativo (mix sin templado). <i>C. fetus</i> : 764 pb; <i>Cfv</i> : 233 pb (Iraola et al. 2012).....	29
<b>Figura 9.</b> Muestra de esmegma prepucial de toro. Placa de agar Skirrow con colonias compatibles con <i>C. fetus</i> .....	31
<b>Figura 10.</b> Colonias de <i>Campylobacter fetus</i> spp. de esmegma prepucial del Toro-Cfv (día 104) observadas en microscopio de contraste de fases con morfología de espirilo (izquierda) e inmunofluorescencia directa anti- <i>Campylobacter fetus</i> con morfología característica de bacilo (espirilos, formas "S" y formas gaviota) y fluorescencia perfiérica intensa (derecha) con microscopio epifluorescente. Objetivo de inmersión en aceite, 1000x.....	31
<b>Figura 11.</b> Curva estándar de PCR en tiempo real con sonda TaqMan-MGB para detección de <i>C. fetus</i> . Rando de concentración de ADN de 50 pg/μL a 5 fg/μL. Se detallan el coeficiente de determinación (R <sup>2</sup> ), la eficiencia de amplificación (Eff%), la pendiente y el intercepto (Y).....	32
<b>Figura 12.</b> PCR multiplex para detección de <i>C. fetus</i> y diferenciación de subespecie de colonias aisladas y muestra clínica de esmegma prepucial (EP) de toro. Electroforesis representativa en gel de agarosa al 1%. Pocillo 2: control positivo Cff, pocillo 3: control positivo cfv, pocillo 4: colonia toro 3 (día 262). Pocillo 12: EP toro 2 (día 52), pocillo 13: EP toro 1 (día 95 h), pocillo 14: EP toro 3 (día 117), pocillo 15: EP toro 2	

(día 117), pocillo 16: colonia toro 2 (día 145), pocillo 19: colonia EP de toro 2 (día 117), pocillo 20: control negativo (mix sin templado). <i>C. fetus</i> : 764 pb; <i>Cfv</i> : 233 pb (Iraola et al. 2012).....	35
<b>Figura 13.</b> Mapa de la provincia de Buenos Aires con partidos donde se ubican los establecimientos ganaderos visitados (punto rojo) con problemas reproductivos asociados a <i>C. fetus</i> : Balcarce (3), Ayacucho (1), Tres Arroyos (1), Mar Chiquita (1) y Tandil (1).....	36
<b>Figura 14.</b> Feto bovino, raza cruzada, 150 días de gestación (ID 7).....	38
<b>Figura 15.</b> Cavidad torácica, feto bovino (ID 7). Se observa pleuritis y pericarditis fibrinosa difusa severa con adherencias a parrilla costal (parte superior de la imagen).....	38
<b>Figura 16.</b> Corte histológico de Pulmón, feto bovino (ID 3). Se observa bronconeumonía neutrofílica difusa, severa. H&E, 40x. ....	39
<b>Figura 17.</b> Corte histológico. Cavidad torácica, feto bovino (ID 7). Se observa pleuritis fibrinosa difusa severa (derecha) con bronconeumonía neutrofílica (izquierda). H&E, 10x. ....	40
<b>Figura 18.</b> Toro-CFV, tracto reproductor. A) Área del fornix (cuadrado amarillo) donde se recolectó la muestra de mucosa prepucial; y B) órganos sexuales accesorios, de los cuales se extrajeron las vesículas seminales (flecha amarilla).....	57
<b>Figura 19.</b> Toro-Cfv, vesículas seminales. A) Cultivo bacteriológico. Colonias de <i>Campylobacter fetus</i> en agar Skirrow. B) Inmunofluorescencia directa positiva de colonias del cultivo bacteriológico con fluorescencia y formas características de <i>C. fetus</i> . Microscopio epifluorescente, objetivo de inmersión en aceite, 1000x.....	59
<b>Figura 20.</b> 1591-PCR para confirmar <i>C. fetus</i> . Electroforesis representativa en gel de agarosa al 1,5%. Columna 1: Toro-Cfvi, mucosa prepucial; columna 2: Toro-Cfvi, semen (día 132); columna 3: Toro-Cfvi, semen (día 39); Columna 4: Toro-Cfvi, semen (día 269); columna 5: Toro-Cfv, vesícula seminal; columna 6: Toro-Cfv, semen (día 269); columna 7: Toro-Cfv, semen (día 82); columna 8: Toro-Cfv, semen (día 39); columna 9: control negativo (agua) y columna 10: control positivo (ADN purificado de <i>C. fetus</i> 97/608). MWM: marcador de peso molecular 1 Kb ladder (Promega).....	60
<b>Figura 21.</b> Toro-Cfvi, mucosa prepucial. Infiltrado linfoplasmocítico, subepitelial, difuso, moderado y nódulo linfoide focal subepitelial. H&E, 10x.....	60
<b>Figura 22.</b> Esquema representativo de seis vaquillonas del GT-Xdd, 4 vaquillonas del GC y el toro-Xdd reintroducidos en un potrero por 67 días. Se detallan los tiempos de muestreo de MCV y EP. <i>Vaquillonas negras</i> : vaquillonas del GC; <i>Vaquillonas naranjas</i> : vaquillonas del GT-Xdd; <i>Toro negro</i> : Toro-Cff.....	65
<b>Figura 23.</b> Esquema representativo de siete vaquillonas experimentalmente desafiadas (CFF-C1N3) (GT), dos toros y seis vaquillonas sin desafío (GC) para estudiar posible transmisión sexual de CFF. Se detallan los tiempos de muestreo de MCV y EP. <i>Vaquillonas naranjas</i> : vaquillonas del GT; <i>Toro negro</i> : dos toros; <i>Vaquillonas negras</i> : vaquillonas del GC.....	66

## RESUMEN

La bacteria *Campylobacter fetus*, es uno de los principales agentes etiológicos que provocan pérdidas reproductivas en bovinos en Argentina. Hay dos subespecies de *C. fetus* relevantes para la salud del bovino: *C. fetus* subsp. *fetus* (Cff) que habita el tracto gastrointestinal y causa abortos ocasionales tras bacteriemia materna, y *C. fetus* subsp. *venerealis* (Cfv) (incluye el biovar *intermedius*; Cfvi), que es huésped exclusivo del tracto genital y causante de la campilobacteriosis genital bovina (CGB), una enfermedad de transmisión sexual que causa bajos porcentajes de preñez.

Se estudió la infección de las 3 subespecies de *C. fetus* (Cff, Cfv y Cfvi) y el comportamiento de técnicas diagnósticas convencionales y moleculares en un modelo experimental bovino. En el mismo se infectaron experimentalmente vaquillonas con la subespecie de *C. fetus* respectiva, y se realizó servicio natural con toros sanos. Se recolectaron muestras de mucus cérvico vaginal (MCV) de las vaquillonas y esmegma prepucial (EP) de toros durante un período de 9 meses, y se procesaron por cultivo bacteriológico, IFD y qPCR (dos métodos de extracción de ADN; In-house y kit comercial), con el objetivo de evaluar el método de diagnóstico adecuado y clarificar la patogénesis de las subespecies. El 87% de las vaquillonas resultó infectada tras inoculación experimental, y al menos una por cada subespecie se mantuvo infectada durante todo el ensayo (285 días). En MCV el cultivo bacteriológico fue la técnica más adecuada (43%). Su consistencia viscosa fue una limitación para la qPCR, donde la recuperación de *C. fetus* con el método de extracción de ADN con kit comercial fue baja (29%), mientras el método de lisis In-house de lisis resultó inadecuada (8%). Todos los toros se infectaron tras servicio natural con respectiva subespecie. La qPCR con extracción de ADN In-house (75%) resultó una alternativa prometedora en EP, comparado con la IFD (63%) actualmente utilizada de rutina. En casos naturales de 7 establecimientos, la detección de *C. fetus* de MCV (n=53) resultó baja siendo el cultivo la técnica más adecuada (13%) seguida de qPCR (7,5%) e IFD (5,6%). Esto se asocia a la capacidad autolimitante de la bacteria y el tiempo de muestreo. De estos establecimientos se analizaron seis fetos abortados, todos identificados como Cff. La diferenciación de subespecie por métodos moleculares y pruebas bioquímicas fueron inconsistentes siendo de escaso valor, por lo que es necesario avanzar en estudios que permitan diferenciar las mismas de forma correcta, y que confirmen la relevancia clínico-epidemiológica de cada subespecie en bovinos.

Por primera vez se reporta el aislamiento de Cfv desde vesículas seminales de un toro naturalmente infectado. Este hallazgo pone de manifiesto otro probable nicho

que permita la persistencia de la bacteria y posible contaminación del semen. Se realizaron otros dos ensayos experimentales con Cff para estudiar su patogénesis, tras la alta persistencia observada en el modelo experimental, comprobándose la transmisión venérea entre vaquillonas y toros.

El uso de qPCR en muestras clínicas resultan prometedoras en EP. Más estudios sobre los métodos de extracción de ADN y diagnóstico molecular son necesarios en muestras de MCV para mejorar su eficiencia. La capacidad venérea, la colonización y la persistencia de Cff en el tracto reproductor de vaquillonas y toros, y alta presencia en fetos bovinos abortados evidencia un alto riesgo en la salud reproductiva de los bovinos, sugiriendo sea incluida en la CGB junto al Cfv.

**PALABRAS CLAVES:** campilobacteriosis, rumiantes, modelo animal, pruebas moleculares, enfermedad de transmisión sexual.

## ABSTRACT

### “STUDY OF THE PATHOGENESIS OF *CAMPYLOBACTER FETUS* IN CATTLE AND USE OF MOLECULAR TESTS FOR ITS DETECTION”

The bacterium *Campylobacter fetus* is one of the main etiological agents that cause reproductive losses in cattle in Argentina. There are two subspecies of *C. fetus* relevant to bovine health: *C. fetus* subsp. *fetus* (Cff) which inhabits the gastrointestinal tract and causes occasional abortions after maternal bacteremia, and *C. fetus* subsp. *venerealis* (Cfv) (includes the biovar *intermedius*; Cfvi), which is an exclusive host of the genital tract and causes bovine genital campylobacteriosis (BGC), a sexually transmitted disease that causes low pregnancy rates.

The infection of the 3 subspecies of *C. fetus* (Cff, Cfv and Cfvi) and the use of conventional and molecular diagnostic techniques in a bovine experimental model were studied. In it, heifers were experimentally infected with the respective subspecies of *C. fetus*, and natural mating was carried out with healthy bulls. Samples of cervical vaginal mucus (CVM) from heifers and preputial smegma (PS) from bulls were collected over a 9-month period, and processed by bacteriological culture, DIF and qPCR (two DNA extraction methods; In-house and commercial kit), with the aim of evaluating the appropriate diagnostic method and clarifying the pathogenesis of the subspecies. An 87% of the heifers were infected after experimental inoculation, and at least one for each subspecies remained infected throughout the trial (285 days). In CVM, bacteriological culture was the most appropriate technique (43%). Its viscous consistency was a limitation for qPCR, where the recovery of *C. fetus* with the DNA extraction method with a commercial kit was low (29%), while the In-house lysis method of lysis was inadequate (8%). All bulls were infected after natural mating with their respective subspecies. The qPCR with in-house DNA extraction (75%) was a promising alternative for detection of *C. fetus* in PS, compared to DIF (63%) currently used routinely. Diagnostic techniques were evaluated in natural cases from 7 cattle farms, where CVM (n=53) and aborted fetuses (n=6) were analyzed. The detection of *C. fetus* from CVM was low, with culture being the most appropriate technique (13%) followed by qPCR (7.5%) and DIF (5.6%). This is associated with the self-limiting capacity of the bacteria and the sampling time. All fetuses analyzed were identified as Cff. The differentiation of subspecies by molecular methods and biochemical tests were inconsistent and of low value, so it is necessary to advance in studies that allow them

to be correctly differentiated, and that confirm the clinical-epidemiological relevance of each subspecies in cattle.

For the first time, the isolation of Cfv from the seminal vesicles of a naturally infected bull is reported. This finding highlights another possible niche that allows the persistence of the bacteria and possible contamination of the semen. Two other experimental tests with Cff were carried out to study its pathogenesis, after the high persistence observed in the experimental model, verifying the venereal transmission between heifers and bulls.

The use of qPCR in clinical samples is promising in PS samples. More studies on DNA extraction and molecular diagnostic methods are needed on CVM samples to improve their efficiency. The venereal transmission, and colonization and persistence of Cff in the reproductive tract of heifers and bulls, with the high presence in aborted bovine fetuses show a high risk to bovine reproductive health, suggesting that it be included in the BGC along with Cfv.

**KEYWORDS:** campylobacteriosis, ruminants, animal model, molecular tests, sexually transmitted disease.

## PUBLICACIONES

### Publicaciones en revistas:

1. **García JA**, Gioffré AK, Acuña J, Méndez MA, Morsella C, Aller JF, Paolicchi FA. Isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* from seminal vesicle of a naturally challenged bull. *Vet Res Comm*, 2021, DOI:10.1007/s11259-021-09823-1. 45:447–452.
2. **García JA**, Soto J, Soto P, Malena R, Morsella C, Méndez A, Fiorentino MA, Acuña J, Luchessi E, Paolicchi F. Evaluation of direct immunofluorescence test for *Campylobacter fetus* spp. in bulls experimentally infected and commensal bacteria from the reproductive tract of bulls. *InVet*, 2021, 23(1):1-14.
3. Farace P.; Irazoqui, J.; Morsella C.; **García J.A.**; Mendez, M.; Paolicchi F.; Amadio A.; Gioffré A. 2021. Phylogenomics of *Campylobacter fetus*: A current approach to shed light on bovine genital campylobacteriosis infection in Argentina. *Vet World*, ISSN:0972-8988.

### Publicación aceptada:

1. Velilla, A., et al. Experimental model in bovine to infection and detection of *Campylobacter fetus* subspecies *fetus* and *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* in fluids and foetal tissue. Aceptado en Revista *InVet*.

### Publicaciones en congresos:

1. Noviembre de 2021: Detección de *Tritrichomonas foetus* y *Campylobacter fetus* spp., por métodos convencionales y moleculares a partir de toros infectados experimentalmente. Soto P, Soto J, **García JA**, Forletti A, Morsella CG, Méndez MA, Elechiribehety R, Paolicchi F, Lucchesi E. XXIII Reunión Científica Virtual de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico (AAVLD).
2. Noviembre de 2021: Colección de *Campylobacter fetus* spp en un laboratorio de bacteriología veterinaria. **García JA**, Salazar V, Méndez A, Morsella C, Fiorentino MA, Cravero S, Farace P, Velilla A, Malena R, Gioffre A, Paolicchi FA. XXIII Reunión Científica Virtual de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico (AAVLD).
3. Octubre de 2021: Campylobacteriosis in beef fetuses: a descriptive study. **García JA**, Paolicchi F, Acuña Y, Fiorentino A, Malena R, Morsella C, Mendez A, Cantón GJ, Scioli V, Morrell E. Aceptado para formato de poster en la XII Reunión Argentina de Patología Veterinaria (RAPAVE) y 14° Seminario de la Fundación CL Davis-SW Thompson, Balcarce, Buenos Aires, Argentina. Modalidad virtual.



4. Abril de 2019: Detección de diferentes subespecies de *Campylobacter fetus* en estudio experimental en bovinos. **García JA**, Acuña J, Gioffre A, Morsella C, Mendez A, Cantón G, Paolicchi F. Jornada FCA Investiga, Balcarce, Argentina.

**Tesinas de posgrado:**

5. Asesor de tesis de especialización en Salud Animal: “PCR multiplex en cepas de *Campylobacter fetus* spp. y tejidos de abortos bovinos: comparación de 3 protocolos”. Med. Vet. Adriana Mujica Speciale. Requisito para el título de Especialista en Salud Animal otorgado por la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Mar del Plata junto al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. CONEAU FCA UNMDP. 2022-en curso.
6. Director de tesis de especialización en Salud Animal: “Capacidad de transmisión venérea de *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* en bovinos”. Med. Vet. Yamila Acuña. Requisito para el título de Especialista en Salud Animal otorgado por la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Mar del Plata junto al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. CONEAU FCA UNMDP. 2020-2022.
7. Director de tesis de especialización en Salud Animal: “Eficiencia del diagnóstico de Campylobacteriosis en toros: uso de distintos métodos de recolección de esmegma prepucial y comparación de técnicas convencionales”. Med. Vet. Joaquin I. Acuña. Requisito para el título de Especialista en Salud Animal otorgado por la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Mar del Plata junto al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. CONEAU FCA UNMDP. 2019-2021.
8. Director de tesis de especialización en Salud Animal: “Susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos de *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* asociados a abortos ovinos y bovinos”. Med. Vet. Juan Livio. Requisito para el título de Especialista en Salud Animal otorgado por la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Mar del Plata junto al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. CONEAU FCA UNMDP. 2022-en curso.

**Publicaciones en preparación:**

1. Bovine campylobacteriosis in bulls: insights in the conventional and molecular diagnosis. **García JA**, Farace P, Gioffre A, Morsella C, Mendez A, Acuña J, Aller JF, Signorini M, Paolicchi F. Enviado (Julio 2022), Brazilian Journal of Microbiology.

2. *Campylobacter fetus* spp. infection in bovine fetuses: retrospective study of 96 cases and literature review. **García JA**, Morrell E, Méndez MA, Morsella C, Malena R, Scioli V, Velilla A, Fiorentino MA, Cantón G, Mujica A, Velilla A, Paolicchi FA.
3. Detection of specific antibodies to *Campylobacter fetus* subspecies *fetus* and *venerealis* in serum, cervical mucus and preputial fluids from experimentally infected cattle. Marcelino R.; **García JA.**; Morsella C.; Paolicchi F.

## 1. INTRODUCCIÓN

### Generalidades

Los índices reproductivos son imprescindibles para mejorar la eficiencia de los sistemas productivos, por lo que su optimización es necesaria para mejorar las tasas de procreo y lograr mayor cantidad de carne producida por superficie. Las pérdidas reproductivas en sistemas ganaderos bovinos tienen un alto impacto en la economía, y en su mayoría son producidas por enfermedades infecciosas. En Argentina se revelan bajos porcentajes de gestación sobre la totalidad de vacas que recibió servicio, lo que afecta negativamente los índices de destete de las diferentes zonas de cría, con un promedio de 64% a nivel nacional (Campero et al. 2017). La campilobacteriosis genital bovina (CGB) es una enfermedad reproductiva, causada por la bacteria *Campylobacter fetus*, presente en países con predominio de sistemas de producción extensivos con servicio natural como en Argentina, donde es considerada endémica con alta incidencia (Mshelia et al. 2010; Campero et al. 2017; Balzan et al. 2020). En datos registrados por el Servicio de Diagnóstico Veterinario Especializado (SDVE) INTA EEA Balcarce, Argentina, de 1.163 fetos bovinos analizados provenientes de la provincia de Buenos Aires, un 35% resultó con diagnóstico de agentes infecciosos, donde *C. fetus* resultó la principal causa de aborto (Cantón et al 2022).

### Campilobacteriosis genital bovina (CGB)

*Campylobacter fetus* es una bacteria gram negativa, microaerófila que comprende tres subespecies, pero solo dos son relevantes para la salud del bovino: *C. fetus* subsp. *fetus* (Cff) y *C. fetus* subsp. *venerealis* (Cfv) (Michi et al. 2015; Campero et al. 2017). El primero, Cff, habita en el tracto gastrointestinal de ovinos y bovinos y puede causar abortos ocasionales por infección materna de origen intestinal, diseminación sistémica y llegada al útero grávido y feto, siendo la fuente de infección la transmisión fecal-oral (Kirkbride 1993; Fiorentino et al. 2017; Campero et al 2017; Sahin et al 2017). Por el contrario, Cfv (incluye el biovar *intermedius*; Cfvi), es huésped restringido del bovino, exclusivo del tracto genital y causante de la CGB. Esta última es una enfermedad de transmisión sexual (venérea), que causa bajos porcentajes de preñez por problemas de infertilidad, muerte embrionaria y fetal, siendo un factor limitante para la productividad (Campero et al 2003; Campero et al 2017). Además de

las bajas tasas de procreo en los rodeos, existen restricciones internacionales por ser considerada de significancia socio-económica y de salud pública (World Organisation for Animal Health [OIE] 2021).

En los toros, Cfv se localiza en las criptas de la mucosa prepucial estableciendo una infección crónica, manteniéndose como portador asintomático (Bon Durant 2005). Las criptas prepuciales proveen de un ambiente microaerófilo que permite la supervivencia y replicación de la bacteria. Mientras en la hembra coloniza el fondo de vagina, cuello uterino y útero, generalmente de forma temporaria siendo autolimitante (3 a 6 meses), aunque se reportan vacas carrier o portadoras, con persistencia de la infección por más de 9 meses (Cipolla et al. 1994; Bon Durant 2005; Campero et al 2017). Esta diferencia puede deberse a que en toros hay menor antigenicidad en comparación con las hembras, asociado a la localización superficial en la mucosa del prepucio y pene llevando a una baja estimulación del sistema inmunitario, con consecuente permanencia de la infección (Bon Durant 2005; Campero et al. 2005). Esta característica del toro hace que sea la principal fuente de diseminación de la CGB transmitiendo la enfermedad en el rodeo durante el servicio natural o mediante inseminación artificial con semen no controlado, dado que la congelación no afecta su viabilidad (Michi et al. 2015; Campero et al. 2017). La presencia de *C. fetus* en semen se asocia a contaminación durante su recolección (Givens 2018). Las hembras portadoras, que pueden ser aproximadamente el 3%, pueden actuar como fuente de infección de toros sanos (Cipolla et al. 1994; Bon Durant 2005). A su vez estas vacas pueden llevar su gestación a término y continuar infectadas entre servicios consecutivos (Corbeil et al. 1981). La infección con Cfv llega al feto vía ascendente por vagina y cérvix tras infección venérea por el toro portador o vía hematogena en el caso particular de las infecciones por Cff (Campero et al. 2017). La capacidad de bacteriemia de Cff en humanos está bien establecida, y en rumiantes es considerada (Monno et al 2004; Sahin et al 2017), sin embargo, no hay a nuestro conocimiento estudios en bovinos que evalúen la presencia de la bacteria en sangre y evidencien el pasaje desde el tracto intestinal al útero grávido. El signo clínico en el rodeo tras infección con Cfv se presenta en la hembra, y está caracterizada por repetición del celo, pérdidas embrionarias y fetales, resultando en bajos porcentajes de preñez que pueden llegar hasta el 25% (Campero et al. 2003; Campero et al. 2017). En el toro no se ha asociado a pérdida de libido o fertilidad, ni anomalías genitales o signos clínicos (Michi et al. 2015). Sin embargo, trabajos *in vitro* muestran tropismo hacia células espermáticas afectando la calidad seminal de los toros (Chiapparone et al.

2016; Cagnoli et al. 2020). Con ambas subespecies, Cff y Cfv, se observó adherencia irreversible a espermatozoides de toro afectando estructura y funcionalidad, pudiendo contribuir a la baja fertilidad observada en rodeos con infección por *C. fetus* (Cagnoli et al. 2020).

Aunque, la infección con Cff no es considerada una enfermedad venérea, siendo la principal vía de transmisión la fecal-oral, la bacteria ha sido recuperada de muestras de secreciones genitales de toros y vaquillonas, asociada a abortos e infertilidad en bovinos (Maclaren y Agumbah 1988; Devenish et al 2005; Mshelia et al 2010; Kienesberger et al 2011; Botelho et al 2014; Clothier y Anderson 2016; Balzan et al. 2020). En estudios experimentales, la subespecie Cff resultó más virulento que Cfv, probablemente por variabilidad en la virulencia con diferente capacidad infectante y resistencia al sistema inmune (Marcellino et al. 2015). Esto difiere de otros trabajos que mencionan a Cfv como el más relevante (Anderson 2007; Michi et al 2015).

### **Diagnóstico de la campilobacteriosis bovina**

Para el diagnóstico de rutina de *C. fetus* en bovinos se utilizan métodos convencionales como cultivo bacteriológico e inmunofluorescencia directa (IFD) o moleculares como la PCR, a partir de muestras de esmegma prepucial (EP), principalmente, como también mucus cérvico vaginal (MCV) y desde los tejidos/fluidos fetales (líquido de abomaso, hígado y pulmón) bovinos.

### **Cultivo bacteriológico**

El aislamiento e identificación de *C. fetus* mediante cultivo bacteriológico es considerada la técnica *gold estándar* (Schulze et al. 2006; OIE 2021) de cualquiera de las muestras previamente mencionadas. Esta técnica tiene como ventaja que permite la discriminación de subespecie, Cff y Cfv, mediante pruebas bioquímicas de las colonias identificadas en pureza, caracterizadas principalmente por su habilidad de desarrollar en glicina al 1%, su capacidad de reducción en selenito de sodio y de producción de H<sub>2</sub>S (Schulze et al. 2006; Marcellino et al. 2015; Silveira et al 2018). Brevemente, Cfv no crece en glicina 1% ni en selenito de sodio, ni tiene la capacidad de producir H<sub>2</sub>S en medio con agregado de cisteína con tiras de acetato de plomo, a diferencia de Cff que crece en ambos y tiene producción de H<sub>2</sub>S (OIE 2021). Sin embargo, las condiciones de crecimiento de *C. fetus* que requieren medios de cultivo

enriquecidos y selectivos y condiciones atmosféricas especiales (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub> a 37°C), dificultan el uso de esta técnica como rutina en laboratorio (van der Graaf-van Bloois et al. 2014; Sahin et al. 2017; Balzan et al. 2020). A su vez, su sensibilidad puede resultar baja ya que *C. fetus* es fácilmente sobrecrecido por la presencia de otras bacterias comensales (Chaban et al. 2013). Respecto a la diferenciación de subespecie mediante pruebas bioquímicas para la caracterización fenotípica de cada subespecie, algunos trabajos reportan total concordancia con diferenciación por PCR (Willoughby et al. 2005; Schulze et al. 2006). Sin embargo, se registran incongruencias con distintos protocolos no pudiendo identificar de forma correcta las cepas de *C. fetus* a nivel de subespecie, existiendo diferencia entre las características fenotípicas y genotípicas (Wagenaar et al. 2001; Vargas et al. 2011; van der Graaf-van Bloois et al. 2014; Del Piazzo et al 2021). Esto se debe en parte por la presencia de C<sub>fv</sub>i con capacidad de producir H<sub>2</sub>S el cual puede llevar a identificación errónea (van der Graaf-van Bloois et al. 2014; Farace et al. 2019), también por genes transferidos entre ambas subespecies o por bajo número de genomas disponibles no pudiendo identificar correctamente islas genómicas específicas, llevando a error en identificación fenotípica o genotípica (Abril et al. 2010; Ali et al. 2012; Kienesberger et al. 2014). En muestras prepuciales de toros la detección de *C. fetus* por cultivo resulta variada según el medio de cultivo utilizado, desde 30% a 82.3% (García Guerra et al. 2014; Marcellino et al. 2015), mientras en MCV resulta baja (28%) (Marcellino et al. 2015). La variabilidad en la eficiencia de detección se ve influenciada por contaminantes y por el medio de cultivo utilizado, donde agar Skirrow resultó el más acorde (Terzolo et al. 1991; Monke et al. 2002; Silveira et al. 2018). En muestras clínicas con alta contaminación se puede incrementar la eficiencia mediante el uso de filtración pasiva previa (Chaban et al 2013). En fetos la muestra de elección para el diagnóstico de *C. fetus* por cultivo bacteriológico es el líquido de abomaso por su baja contaminación, seguido de pulmón e hígado (Campero et al. 2003; Morrell et al. 2011; Silveira et al. 2018; Breyer et al. 2021).

### **Inmunofluorescencia directa (IFD)**

La IFD es una técnica rápida y de bajo costo, de gran ventaja para estudios poblacionales como método de screening de muestras prepuciales de toros, ampliamente utilizada (Chaban et al 2013; Campero et al. 2017; Silveira et al 2018; Balzan et al. 2020). La técnica se realiza a partir de muestras clínicas conservadas en

solución fisiológica formolada al 1% (SFF 1%) o para confirmar la identificación de *C. fetus* de aislamientos con previa conservación en SFF 1% por al menos 24h. Sin embargo, no permite diferenciar entre subespecies de *C. fetus*, debido a que ambas son antigénicamente casi idénticas. La visualización microscópica puede verse afectada por contaminación con detritos celulares u otros elementos sumado a una baja concentración de *C. fetus* en la muestra (Figueiredo et al. 2022). Por lo tanto, el rendimiento de la técnica está directamente relacionado con la calidad de la muestra, el microscopio utilizado y la experiencia del observador, ocasionando una baja sensibilidad.

La aplicación de esta técnica en muestras de esmegma prepucial (EP) han determinado rangos de sensibilidad variable desde 43,7% a 92,6%, y de especificidad desde el 89% a 94,4% (Cipolla et al. 1994; Figueiredo et al. 2002; Rocha et al. 2009; García Guerra et al. 2014; Marcellino et al. 2015; Campero et al. 2017). La aplicación en MCV es escasa reportando una baja tasa de detección (36%), incluso con previo enriquecimiento en agar semisólido selectivo (Marcellino et al. 2015). El MCV tiene menos contaminantes que las muestras de EP, sin embargo, la concentración de la bacteria es muy variable principalmente dependiendo del ciclo estral y periodo de gestación de la hembra lo cual, junto a la consistencia viscosa, dificulta su manejo (Yarohkno 2015). En menor medida, se utiliza la técnica en muestras de líquido abomasal y pulmón de fetos bovinos abortados (Morrell et al 2011; Macías-Rioseco et al 2015).

### **Diagnóstico molecular**

La baja sensibilidad de las técnicas convencionales, incapacidad de diferenciar subespecie por parte de la IFD y la dificultad del cultivo han llevado a la utilización de técnicas moleculares de base PCR, más sofisticadas y eficaces para la identificación de *C. fetus*, y discriminación de subespecies (Hum et al. 1997; Abril et al. 2007; van der Graaf-van Bloois et al. 2013; McGoldrick et al. 2013).

Al momento se han descrito 10 genes blanco diferentes para la detección de *C. fetus* y la discriminación de subespecies (OIE 2021). Sin embargo, a pesar de que varios protocolos fueron desarrollados para la identificación del patógeno, la mayoría fueron pobremente evaluados en muestras clínicas de bovinos.

Varios reportes de trabajos que emplean distintos protocolos de PCR muestran una mayor eficacia que las pruebas convencionales (cultivo bacteriológico o IFD)

principalmente en muestras de EP (McMillen et al. 2006; Groff et al. 2010; Schmidt et al. 2010; García Guerra et al. 2014; Del Piazzo et al. 2021; Polo et al. 2021; Mederos et al. 2022). El primer protocolo de PCR multiplex fue descrito por Hum et al. (1997) para detección de *C. fetus* e identificación de Cfv. Luego se desarrollaron protocolos de PCR cuantitativa (qPCR) con los mismos propósitos, ya sea detectando el producto con sondas o con el fluoróforo SYBR Green. Estos protocolos emplean los mismos genes descritos para PCR en tiempo final (McMillen et al. 2006; García Guerra et al. 2014), aunque también se incorporaron nuevos (van der Graaf-van Bloois et al. 2013; Iraola et al. 2016; Del Piazzo et al. 2021). Se obtuvo con estos protocolos una mejor sensibilidad que la PCR convencional (McMillen et al. 2006; Chaban et al. 2012; McGoldrick et al. 2013; van der Graas-van Bloois et al. 2013; Waldner et al. 2013; Iraola et al. 2016; Polo et al. 2021)

Respecto a la sensibilidad de la qPCR en relación a otras pruebas, parecería haber cierto consenso en los distintos trabajos. García Guerra y col. muestran diferencias significativas en la detección de *C. fetus* a partir de EP de toros, obteniendo un mayor porcentaje de positividad por qPCR (85,4%) comparado con la IFD (32,7%) o el cultivo (30 a 82,3%) (García Guerra et al. 2014). Estos resultados son coincidentes con los de otros autores que obtuvieron entre 15,6-24%, por qPCR o mPCR, contra 2,8-5,2% por cultivo (McMillen et al. 2006; Groff et al. 2010). Sin embargo, los trabajos de Schmidt y col. y de Delpiazzo y col. obtuvieron una eficiencia similar entre qPCR y cultivo (2,5 vs. 2,1 y 4,2% vs. 3,8%, respectivamente) (Schmidt et al. 2010; Delpiazzo et al. 2021).

Aunque la mayoría de los trabajos sugiere que la eficiencia de las técnicas moleculares es mayor, la sensibilidad aún puede ser moderada a baja (Polo et al. 2021; Mederos et al. 2022). Las muestras clínicas de EP de distintos toros, presentan variabilidad en la detección de *C. fetus*. Esto puede deberse a la presencia de compuestos inhibidores para la PCR como sangre, materia fecal u otros contaminantes (Wilson 1997; Radstrom et al. 2004; McMillen et al. 2006). Por lo que en muestras de campo los resultados presentan menor sensibilidad (Mederos et al. 2022). Esto ha llevado al uso de la PCR a partir de aislamientos puros de cultivo y no a partir de la muestra clínica (Chaban et al. 2012; Hosseinzadeh et al. 2013). Este es un punto que debe ser optimizado, estudiando un mayor número de muestras de campo.

Mientras las muestras de EP son las más estudiadas, no ocurre lo mismo con las muestras de MCV de vacas, donde la información respecto al procesamiento de estas muestras clínicas es muy escasa. La consistencia altamente viscosa y la



variación en la concentración de *C. fetus* en el tracto reproductor femenino, tanto por el ciclo estral como por causas inmunopatológicas, dificulta su empleo como muestra de rutina (Yarohkno et al. 2015; Campero et al. 2017). En un trabajo previo se observó una mayor tasa de detección por PCR (7.8%) respecto del cultivo (2,8%) (Groff et al. 2010). Por otro lado, otros autores obtuvieron mejores resultados con el cultivo (29%) respecto a qPCR (15,5% a 21%, según método de extracción de ADN) (Yarohkno 2015).

Otros trabajos utilizaron la PCR como método para determinar prevalencia de *C. fetus* en la región, pero sin fines comparativos con las técnicas convencionales (de Oliveira et al. 2015; Oliveira Filho et al. 2018) o también fue empleada a partir de los aislamientos para identificación de Cfv (Hosseinzadeh et al. 2013).

Sin embargo, a nivel de diferenciación de subespecies los resultados no son consistentes. Estas inconsistencias se han presentado por la alta identidad de secuencia entre las subespecies, por el uso de secuencias o islas de patogenicidad que están presentes en ambas subespecies o incluso otras especies bacterianas (Schulze et al. 2006; Moolhuijzen et al 2009; Abril et al 2010; Spence et al 2011; Ali et al 2012; van der Graaf-van Bloois et al., 2013; Sanhueza et al. 2014; van der Graaf-van Bloois et al., 2014; Michi et al., 2015; Calleros et al. 2017; Silva et al 2020; Polo et al 2021).

Cfv y Cff tienen distinta preferencia de nichos ecológicos e incluso de hospedadores; sin embargo, tienen una alta similitud genética dificultando la identificación de regiones únicas (Kienesberger et al. 2014; Michi et al. 2015). Esto refuerza la hipótesis de que Cfv es un clon mutado de Cff, que se comporta como patógeno estricto del tracto genital incapaz de infectar múltiples especies (van Bergen et al. 2005a). El análisis de 14 cepas de *C. fetus* demostró que la adaptación de Cfv al tracto reproductivo bovino está relacionado con el aumento del tamaño y plasticidad del genoma por la adquisición de varios elementos móviles, incluyendo factores de virulencia (Nadin-Davis et al. 2021).

Como se mencionó anteriormente, la PCRm diseñada por Hum y col. ha sido la más difundida en los laboratorios. Esta se basa en la amplificación de dos genes, donde el gen *parA* diferenciaría a Cfv. Sin embargo, este gen ha sido encontrado en varias cepas. El gen se localiza en islas genómicas que, como elementos móviles también pudieron haber sido adquiridos por transferencia horizontal de genes por cepas de *C. hyointestinalis* o de Cff (Abril et al. 2010; Spence et al. 2011).

Particularmente, el laboratorio de Bacteriología del INTA EEA Balcarce junto a la Sección de Genética Evolutiva de la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República Oriental del Uruguay han desarrollado protocolos basados en PCR para la identificación *C. fetus* y diferenciación de subespecies utilizando cepas de aislamientos regionales en bovinos (Iraola et al. 2012; Iraola et al 2016).

Las dificultades en la detección y discriminación correcta como así también la no estandarización de las mismas como métodos de diagnóstico de rutina, pone de manifiesto la necesidad de mejorar las herramientas de diagnóstico molecular y correlacionar los hallazgos de laboratorio con la situación reproductiva de los predios. A su vez, es necesario adecuar los estudios genómicos de cepas de *C. fetus* que permitan la correcta caracterización molecular y diferenciación genotípica. Por otro lado, es necesario el estudio de variabilidad genética de las cepas recuperadas para conocer los mecanismos de patogenicidad y virulencia implicados, como referencia importante para comparar virulencia y asociación con el hospedador.

Las cepas tipificadas aportarán al desarrollo de otros métodos diagnósticos y de inmunógenos locales que como medida preventiva permitan un mejor nivel de procreo nacional.

Considerando la importancia de la CGB en Argentina en función a su relación con pérdidas reproductivas, en este proyecto se llevará a cabo un modelo experimental bovino que permita validar pruebas rápidas de diagnóstico molecular, así como también estudiar casos naturales de campo, para correlacionar los hallazgos de laboratorio y experimentales con la situación reproductiva de los predios. El modelo experimental permitirá conocer y profundizar en la patogenia de las tres subespecies implicadas en la campilobacteriosis bovina.

## HIPÓTESIS

La implementación de técnicas moleculares basadas en PCR, a partir de muestras clínicas de hembras y machos bovinos, provenientes de un modelo experimental y de infecciones de campo, permitirá mejorar la detección de *Campylobacter fetus*.

## OBJETIVO GENERAL

Mejorar el conocimiento de la patogenia de la bacteria empleando un modelo de infección experimental e implementar un procedimiento de diagnóstico, basado en técnicas moleculares que permita optimizar la capacidad de detección de la campilobacteriosis genital bovina en rodeos bovinos de Argentina.

Estudiar el comportamiento de las distintas subespecies en el modelo bovino experimental en muestras no convencionales (sangre y órganos sexuales accesorios) como así también la persistencia y transmisión entre los animales.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Desarrollar un modelo experimental bovino con cepas autóctonas de *C. fetus* que permitan la puesta a punto de los protocolos en muestras clínicas (fluidos genitales).
- 2) Adaptar, estandarizar y aplicar una prueba molecular real time-PCR (qPCR) para optimizar la capacidad de diagnóstico de pérdidas reproductivas por *C. fetus* en muestras de tracto genital de bovinos (hembra y macho).
- 3) Comparar la eficiencia de los distintos métodos convencionales (cultivo bacteriológico e inmunofluorescencia directa) con los moleculares (qPCR) para la detección de cepas de *C. fetus* a partir de muestras de fluido genital (toros y hembras infectadas o abortadas).
- 4) Evaluar la técnica de PCR multiplex como prueba de un solo paso en muestras extraídas de fluido genital (toros y hembras abortadas) y fluido/tejido de fetos bovinos abortados en casos naturales.
- 5) Estudiar la patogenia de *C. fetus* y su detección en órganos sexuales accesorios y sangre mediante técnicas convencionales y moleculares en un modelo experimental bovino.
- 6) Evaluar la transmisión sexual de *C. fetus* subsp. *fetus* en bovinos como vía de transmisión en un modelo experimental.

## CAPÍTULO 1

### EVALUACIÓN DE LA INFECCIÓN POR *CAMPYLOBACTER FETUS* EN UN MODELO EXPERIMENTAL BOVINO Y EN CASOS NATURALES DE CAMPO: UTILIZACIÓN DE TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS CONVENCIONALES Y MOLECULARES EN SECRECIONES GENITALES Y TEJIDOS FETALES.

#### 1.1 MATERIALES Y MÉTODOS

##### 1.1.1 Animales y grupos experimentales

Se trabajó con 30 vaquillonas, raza Aberdeen Angus y sus cruizas, vírgenes con adecuado desarrollo genital, actividad ovárica cíclica mediante ecografía transrectal, y buena condición corporal. Las mismas fueron mantenidas en un potrero con buena disponibilidad forrajera en la Reserva Ganadera N° 5 de la EEA INTA en Balcarce (**Fig. 1**). Fueron previamente analizadas para Brucelosis (serología por BPA y FPA) según normas nacionales del programa de Brucelosis del SENASA, Neosporosis (ELISA) y enfermedades de transmisión sexual (Campilobacteriosis y Tricomonosis genital) (cultivos e inmunofluorescencia directa) utilizando técnicas sugeridas por la Comisión Científica de Enfermedades Venéreas y Neospora de la AAVLD, resultando negativas.



**Figura 1.** Selección de vaquillonas Aberdeen Angus para el ensayo de infección experimental de *C. fetus* en la Reserva Ganadera número 5 (INTA EEA Balcarce).

Las vaquillonas fueron separadas en 3 grupos tratados (GT) con 8 animales por grupo, las cuales fueron desafiadas con 3 cepas distintas de *Campylobacter fetus*: *C. fetus* spp. *fetus* (Cff), *C. fetus* spp. *venerealis* (Cfv) y *C. fetus* spp. *venerealis* biovar *intermedius* (Cfvi), respectivamente, previamente caracterizadas mediante pruebas bioquímicas y moleculares (Iraola et al. 2013; Marcellino et al. 2015; Calleros et al. 2017; Farace et al. 2019), y un grupo control (GC) de 6 animales que permanecieron sin desafiar.

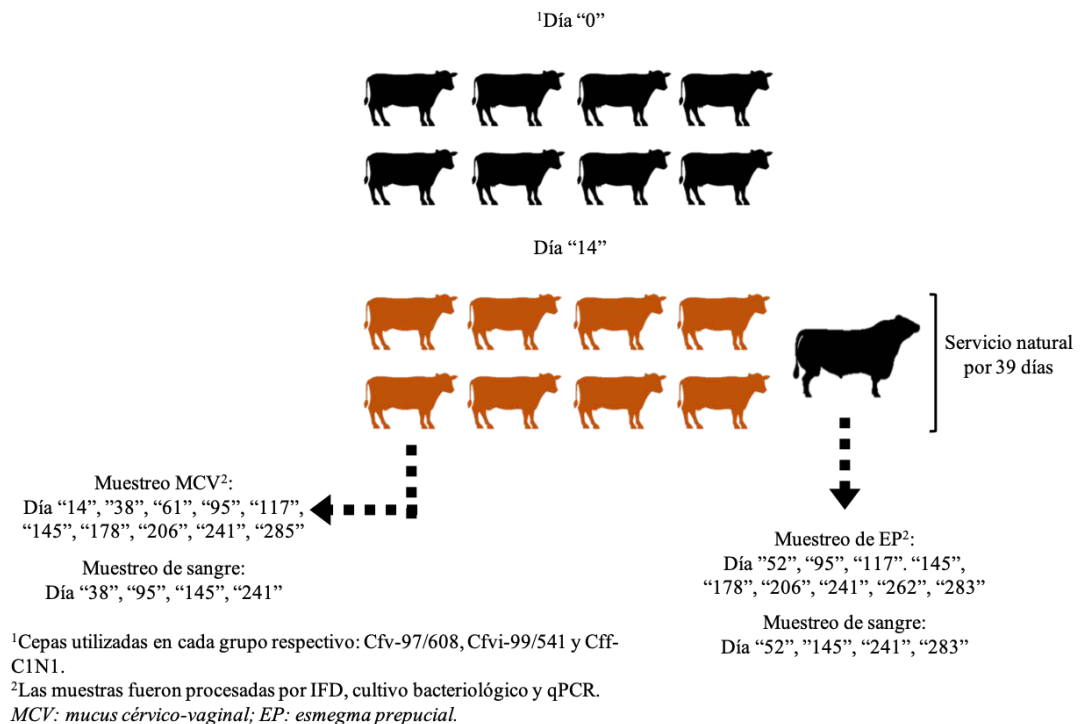
El objetivo de preñez se llevó a cabo mediante inseminación artificial a tiempo fijo (IATF), y repaso con toros por un período de 39 días. Brevemente, se utilizó un dispositivo intravaginal impregnado de progesterona más benzoato de estradiol. A los 8 días se retiró el dispositivo y se administró prostaglandina (cloprostenol). A las 24 h se administró benzoato de estradiol, y se realizó la IATF a 52 – 54 horas del retiro del dispositivo (Monteserin et al. 2018). Para el repaso con toros se asignó un toro, Aberdeen Angus, de 4 a 5 años por grupo experimental, reproductivamente apto tras revisión clínica-genital. Al igual que las vaquillonas, los toros fueron analizados para enfermedades de transmisión sexual (Campilobacteriosis y Tricomonosis genital) y Brucelosis, resultando negativos en las mismas pruebas de cultivo e inmunoserológicas.

Los procedimientos experimentales se llevaron a cabo tras aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAE, INTA-CeRBAS, Argentina): Aval número 163/2018.

El ensayo fue dividido en 2 etapas de infección (**Fig. 2**):

1. Etapa 1, desafío experimental (DE): cada vaquillona de los GT fue desafiada experimentalmente con CFF, CFV y Cfvi respectivamente, mediante inoculación intrauterina (día 0).
2. Etapa 2, desafío natural (DN): al día 14 pos-inoculación (PI) se ingresó un toro por cada GT y al GC, por 39 días de servicio. Cada grupo de vaquillonas junto al toro respectivo fueron mantenidos en potreros separados sin contacto entre los 4 grupos (GT y GC).

El diagnóstico de gestación se realizó al día 38 y 61 PI mediante ecografía transrectal (Mindray DP 10 Vet) y se repitió cada 30 días mediante palpación transrectal hasta finalizar el ensayo (283 días). Durante estas 2 etapas se recolectaron muestras de secreciones genitales y de sangre de los toros y vaquillonas para diagnóstico por inmunofluorescencia (IFD), cultivo bacteriológico y qPCR.



**Figura 2.** Esquema representativo del procedimiento experimental. Tres grupos de vaquillonas (n=8 por grupo). Fueron experimentalmente desafiadas con una cepa de *C. fetus* subesp. *venerealis*, *C. fetus* subsp *venerealis* biovar intermedius y *C. fetus* subsp. *fetus* respectivamente y mantenidas en un potrero con un toro por 39 días. Se detallan los tiempos de muestreo de mucus cérvico vaginal (MCV), esmegma prepucial (EP) y sangre. Vaquillonas negras: no infectadas con *C. fetus*; vaquillonas naranjas: vaquillonas experimentalmente desafiadas con la cepa de *C. fetus* respectiva.

### 1.1.2 Preparación de los inóculos para el desafío e infección experimental

Se seleccionaron como inóculo las cepas de Cff (C1N3), Cfv (97/608) y Cfvi (99/541) del cepario del Laboratorio de Bacteriología de la EEA INTA, Balcarce, siendo todas ellas aislamientos regionales de casos CGB de campo. Las cepas fueron tipificadas mediante pruebas bioquímicas siguiendo los estándares internacionales y caracterizadas por métodos moleculares de tipificación (Cipolla et al. 1998; Iraola et al. 2013; Iraola et al. 2016; Calleros et al. 2017; Farace et al. 2019).

El genoma completo de CFV-97/608 y Cfvi-99/541 se encuentran disponibles en el GenBank (números de acceso CP008810-CP008812 y ASTK00000000, respectivamente). La cepa C1N3 fue identificada como Cff mediante cultivo bacteriológico y clasificación fenotípica y posteriores estudios moleculares (Iraola et al. 2012; Iraola et al. 2016; Calleros et al. 2017; Farace et al. 2019).

El inóculo fue preparado colectando colonias bacterianas de placas de Agar sangre Columbia (ASC) y Agar Skirrow modificado (ASK) (Terzolo et al. 1991). Luego fueron inoculadas en tubos con medio agar *Brucella* semisólido modificado (ABS),

incubadas por 36h, y luego, el crecimiento bacteriano de cada tubo se recolectó en tubos estériles individuales para cada vaquillona y se calculó la concentración del inóculo (UFC/ml) (Miles & Misra 1938).

A cada vaquillona de los grupos tratados se les realizó una inoculación intrauterina ( día 0), de 2 ml de cada cepa (Cff, Cfv y Cfvi) suspendida en 3 ml de agar *Brucella* semisólido. La concentración del inóculo fue de  $7,83 \times 10^8$  CFU/ml,  $1,383 \times 10^8$  UFC/ml y  $7 \times 10^8$  UFC/ml para Cfvi, Cfv y Cff, respectivamente.

La inoculación experimental se llevó a cabo inmediatamente posterior a la inseminación artificial de cada vaquillona con el objetivo de mimetizar la transmisión venérea natural que ocurre tras la monta con toros infectados.

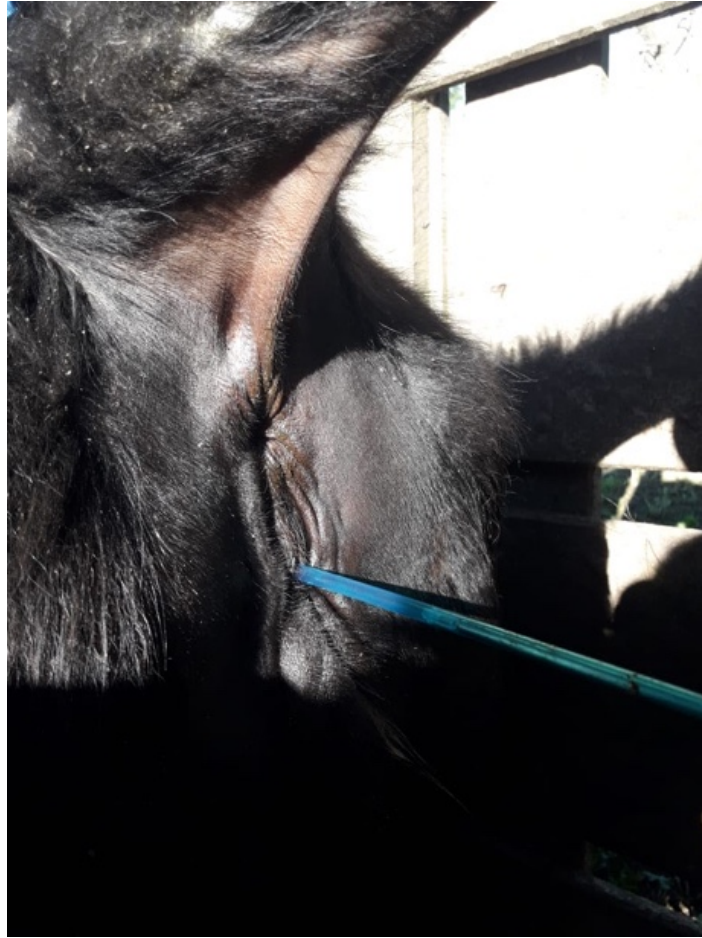
### **1.1.3 Recolección de muestras de fluido genital, semen y sangre de hembras y machos bovinos**

Se recolectaron muestras de mucus cérvico-vaginal (MCV) en los días 0 (control negativo), 14, 38, 61, 95, 117, 145, 178, 206, 241 y 285 (**Fig. 3**) mediante pipeta de Cassou y se transportaron al laboratorio refrigeradas en medio Cary Blair dentro de las 2 h de obtenidas para realizar cultivo bacteriológico, inmunofluorescencia directa (IFD) (previo pre enriquecimiento en ABS por 48 h y posterior pasaje a una solución formolada tamponada pH 7.0 al 1% (SFF1%)), PCR y qPCR para detección de *C. fetus*.

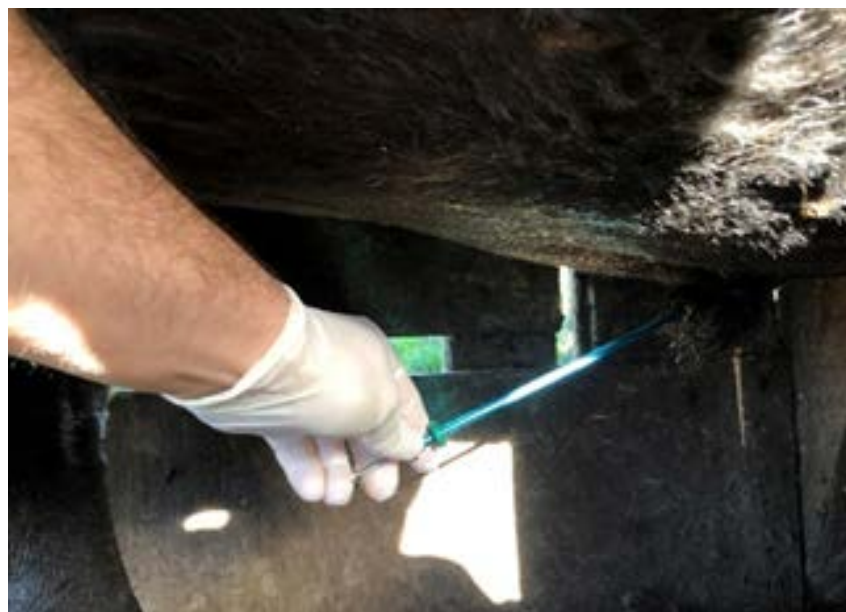
Se recolectaron muestras de esmegma prepucial (EP) a partir de todos los toros al día 52, 95, 117, 145, 178, 206, 241, 262 y 283 mediante el método de aspiración con pipeta de Cassou (**Fig. 4**). Las muestras fueron depositadas en tubos conteniendo medio Cary Blair y SFF1%, y transportadas al laboratorio dentro de las 2 h de obtenidas para realizar cultivo bacteriológico, IFD y qPCR.

A su vez se recolectaron muestras de sangre entera los días 38, 95, 145 y 241 a partir de las vaquillonas y a los días 52, 145, 241 y 283 a partir de los toros para realizar cultivo bacteriológico y qPCR.





**Figura 3.** Muestreo de mucus cérvico vaginal de vaquillonas mediante aspiración con pipeta de Cassou.



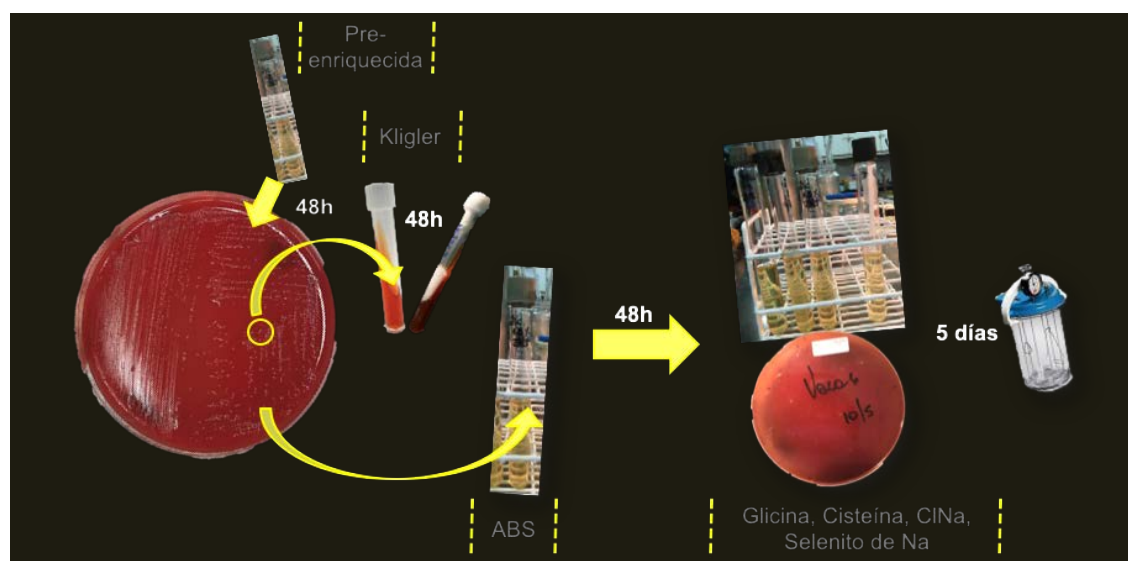
**Figura 4.** Muestreo de esmegma prepucial de toro con el método de aspiración con pipeta de Cassou.



## 1.1.4 Análisis de las muestras y técnicas empleadas

### 1.1.4.1 Cultivo bacteriológico

Las muestras de EP se sembraron en placas de ASK modificado con 7% de sangre equina hemolizada y antibióticos (Terzolo et al. 1991). Los antibióticos usados fueron 1,25 IU/ml sulfato de polimixina, 5 mg/ml trimetoprim, 10 mg/ml vancomicina y 50 mg/ml cicloheximida (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Las placas fueron incubadas a 37°C en atmósfera microaerófila (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> y 85% N<sub>2</sub>) por 48h y se examinaron a diario durante 10 días. Las colonias con morfología compatible con *C. fetus* (lisas, 1 a 2 mm de diámetro, convexas, blanco-grisáceas y translúcidas) se observaron en un microscopio de contraste de fases para constatar morfología bacteriana y el movimiento en tirabuzón característico del género *Campylobacter*. Estas colonias fueron repicadas a tubos con medio Kligler en pico de flauta para determinar especie *C. fetus* sobre la base de la actividad de la enzima catalasa (positiva) y la producción de gas ácido sulfhídrico (negativa). Para la caracterización fenotípica de subespecie se efectuó un panel bioquímico evaluando en las colonias aisladas: reducción de nitratos en agar selenito de sodio, capacidad de crecimiento en glicina 1% y 1,3%, supervivencia en cloruro de sodio y producción de sulfhídrico en medio sensibilizado con tiras de acetato de plomo (suplementado con 0,02% cisteína-HCl) (Vargas et al. 2003; Schulze et al. 2006; OIE. 2021) (**Fig. 5**).



**Figura 5.** Esquema representativo de sembrado de muestras de MCV en placa para cultivo y pruebas bioquímicas a partir de colonias compatibles con *Campylobacter* para confirmar especie *C. fetus* (Kligler) y diferenciar subespecie (glicina, cisteína, CINA, selenito de Na). Nota: La incubación se realizó a 37°C bajo condiciones de microaerofilia.

Las muestras de MCV, previo a la siembra en ASK, fueron incubadas 48 h a 37°C en atmósfera microaerófila en agar *Brucella* semisólido (pre-enriquecimiento) con antibióticos. Los antibióticos usados para este tipo de muestras fueron 1,25 IU/ml sulfato de polimixina, 0,3gr/10ml mg/ml bacitracina, 5 mg/ml novobiocina y 50 mg/ml cicloheximida (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

#### **1.1.4.2 Inmunofluorescencia directa (IFD)**

Para la detección de la bacteria por medio de IFD en secreciones genitales o colonias se utilizó un conjugado fluorescente comercial anti-*Campylobacter fetus* según indicaciones del fabricante (CONJUGADO CAMPY®, Laboratorio Biológico de Tandil SRL, Argentina). Se utilizó un microscopio epifluorescente (Olympus CX31, Zhejiang, China) con lente de inmersión a 100x para observación de los preparados. Las muestras que mostraban al menos una bacteria que presentaba la fluorescencia y morfología típica de *C. fetus* se consideraron positivas (OIE 2021). Se incluyeron controles positivos y negativos en cada preparación.

#### **1.1.4.3 Análisis mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR)**

Luego de la recolección, las muestras clínicas de EP, MCV y sangre fueron almacenadas en freezer a -80°C hasta su procesamiento.

Se utilizaron dos métodos de extracción de ADN a partir de las muestras de EP y MCV: un método In-House cedido por BIOTANDIL® (Laboratorio Biológico Tandil SRL) (IH-LBT) ligeramente modificado y un kit comercial (Inbio Highway® DNA Puriprep-S).

En el método IH-LBT, a cada muestra de esmegma prepucial o mucus cérvico vaginal se le agregó 500 µl de solución fisiológica y fueron centrifugadas a 12.000 xg por 5 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* con 100 µl Tris-EDTA (Inbio Highway®). Luego, las muestras fueron lisadas en un termobloque a 100°C por 15 min con agitación cada 5 min y posteriormente centrifugadas a 12.000 xg por 5 min. Se recuperó el sobrenadante conteniendo el material genético y se colocó en un microtubo de 1,5 ml para emplear como templado.

El método de extracción de ADN con kit comercial se llevó a cabo según las instrucciones de los fabricantes para muestras de esmegma prepucial o mucus cérvico vaginal (Inbio HighWay® DNA Puriprep-S kit). En el caso de las muestras de sangre

entera, se utilizó solo el kit comercial como método de extracción de ADN siguiendo las instrucciones para muestras de sangre (Inbio HighWay® DNA Puriprep-S kit).

Para la qPCR se llevó a cabo el protocolo descrito por Iraola y col., con un volumen de reacción de 10 µL. El set de primers para amplificar una secuencia de 78 pb del gen 16S ARN ribosomal fue: 16SFw: 5'GCACCTGTCTCAACTTTC3' y 16SRv: 5'CCTTACCTGGGCTTGAT3', con una sonda fluorescente TaqMan-MGB (16SPb: 5'-VIC-ATCTCTAAGAGATTAGTTG-MGB/NFQ-3'), que tiene como blanco una región polimórfica de 19 pb que discrimina *C. fetus* de otras especies de *Campylobacter* y otras bacterias (Iraola et al., 2016). Se utilizó la mix SsoAdvanced Universal Probes Supermix (Biorad®) (5 µl), con 1 µl (900 nM) de cada primer, 1 µl de ADN, 1.25 µl (250 mM) de sonda y 0,75 µl de agua destilada libre de nucleasas. Las condiciones de reacción fueron: activación de polimerasa y pre-desnaturalización a 95°C por 3 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 s y 60°C por 60 s, utilizando un equipo StepOnePlus™ Real-time (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA).

Los controles positivos (Cff, Cfv y Cfvi) fueron cepas referenciadas mantenidas en el cepario del Laboratorio de Bacteriología del EEA Balcarce del INTA, rutinariamente utilizadas como controles para diagnóstico de laboratorio. Como controles negativos se empleó ADN de bacterias *Campylobacter* non-fetus (*C. jejuni*, *C. sputorum* subsp. *bubulus*, *C. coli* y *C. hyointestinalis*) y otras bacterias non-*Campylobacter* no relacionadas (*Salmonella*, *Proteus* spp., *Arcobacter* sp., *Trueperella pyogenes*, *Pasteurella* sp., *Pseudomona aeruginosa* y *E. coli*). Se utilizó una curva estándar de 5 puntos por duplicado en cada corrida de qPCR. La curva estándar se construyó con una serie de diluciones seriadas al 1/10 de una alícuota ADN genómico purificado con kit comercial a partir de la cepa *C. fetus* subsp. *fetus* 04-554 (rango 50 pg/µl to 5 fg/µl).

En 34 muestras clínicas de MCV (n=24) y EP (n=10), se seleccionó el gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Fw: 5'CACCCTCAAGATTGTCAGCA3'; Rv: 5'GGTCATAAGTCCCTCCACGA3') como control endógeno para qPCR para detectar muestras con bajo contenido de ADN o inhibidas (Okuda et al. 2010). La qPCR se realizó con FastStart Universal SYBR Green Master mix (Rox) (Roche Diagnostics Deutschland), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Adicionalmente con 15 muestras de MCV (positivas al cultivo bacteriológico) se realizó un procesamiento previo a la extracción de ADN con el fin de disolver la matriz viscosa del MCV y así ser más eficiente el método, lo cual permite aumentar la sensibilidad de las pruebas moleculares. El mismo consta de una solución de 500 µl de buffer de lisis (10mM Tris, 25 mM EDTA, 100mM ClNa y 0,5% sodio dodecil sulfato) con

50µg/ml de proteinasa K suspendido, por muestra de MCV (100-150 µl). Se agitó la solución con cada muestra de MCV mediante vortex y se incubaron en baño húmedo “overnight” a 37 °C (Sambrook et al. 1989). Luego se realizó el protocolo de extracción de ADN con kit comercial según las instrucciones de los fabricantes para muestras de MCV (Inbio HighWay® DNA Puriprep-S kit). Para la detección de *C. fetus* se llevó a cabo el protocolo de PCR descrito por Iraola y col. (2012).

#### **1.1.4.4 Detección de límites de sensibilidad y especificidad en muestras clínicas: inoculación experimental *in vitro* en mucus cérvico vaginal bovino.**

Con el objetivo de evaluar el rendimiento del protocolo que contempla la extracción de ADN y la detección de *C. fetus*, se inocularon experimentalmente muestras de MCV de vaquillonas sanas con diferentes concentraciones de bacterias de la cepa CFV-97/608. Para preparar el inóculo, se sembraron colonias de la cepa en caldo de Brucella semi-sólido (OXOID®, UK) y se incubó a 37°C bajo condiciones de microaerofilia por 18-24h. Luego, cada inóculo fue observado en microscopio de contraste de fases para evaluar motilidad y morfología. La concentración del inóculo se calculó usando la técnica de Miles & Misra (1938). Se realizaron diluciones seriadas de  $10^8$  a  $10^2$  UFC/mL en solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7.5, para infectar las muestras de MCV (mL/gr). Como control negativo se usaron muestras de MCV negativas inoculadas solo con PBS.

Para evaluar la especificidad, se empleó ADN purificado de bacterias relacionadas y bacterias que comparten nicho (*C. jejuni*, *C. sputorum* subsp. *bubulus*, *C. coli*, *C. hyointestinalis*, *Salmonella* sp., *Proteus* sp., *Arcobacter* sp., *Trueperella pyogenes*, *Pasteurella* sp., *Pseudomonas aeruginosa* y *E. coli*).

Se aplicó el protocolo de qPCR a estas muestras con ADN extraído con los métodos In-House y con el kit comercial Inbio Highway®. Previo a la extracción de ADN, debido a la consistencia viscosa del MCV se prepararon las muestras como sigue (para ambos métodos de extracción): 1) homogeneización mecánica (homogeneizado con vortex y pipeta de pasteur), 2) Tratamiento con L-cisteína (2:1) y 3) Sonicación (15 seg, pulsos de 15/05, amplitud 1 en 50%, tiempo total de 1 min).

#### 1.1.4.5 Análisis mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa multiplex (mPCR)

Se empleó la mPCR descrita por Iraola y col. (2012) para la detección de *C. fetus* y la identificación de subespecie en muestras clínicas de EP (n=12), MCV (n=17), pulmón (n=10) y líquido de abomaso (n=10) de fetos, como de colonias aisladas de EP y MCV (n=9).

Para la mPCR se llevó a cabo el protocolo descrito por Iraola y col. (2012). Este protocolo emplea el set de primers para amplificar una secuencia de 764 pb del gen *cstA* específica para *C. fetus*, descrito por Hum y col. (2007): MG3F (5´ GGTAGCCGCAGCTGCTAAGAT 3´) y MG4R 5´ (TAGCTACAATAACGACAAC 3´), pero emplea un segundo par de primers distinto. Estos oligonucleótidos amplifican una región de 233 pb del gen *virB11* presente en Cfv: nC1165g4F (5´ AGGACACAAATGGTAACTGG 3´) y nC1165g4R (5´ GATTGTATAGCGGACTTTGC 3´). Esta PCR multiplex amplificará el amplicon de 764 pb y de 233 pb si corresponde a Cfv, o solo el amplicon de 764 bp si corresponde a Cff. Para la reacción se utilizó 1,56 µl (0,625 µM) de cada primer MG3F/MG4R, 0,95 µl (0,375 µM) de cada primer nC1165g4F / nC1165g4R, 5 µl de ADN, 2,5 µl de buffer 50 mM Tris-HCl 1x, 1 µl (2mM) de Cl<sub>2</sub>Mg 50mM, 2 µl (0,2 mM) de dNTP (mix) 2,5 mM, 0,25 µl de *taq* DNA polimerasa (1,25 U/ensayo) y 9,3 de ddH<sub>2</sub>O libre de RNasa en un volumen de reacción de 25 µl. Las condiciones de reacción fueron: activación de polimerasa y pre-desnaturalización a 95°C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 s, 53°C por 30 s y 72°C por 1 min, y una extensión de 72°C por 5 min, utilizando un equipo Bioer™ Lifetouch Thermal Cycler (Hangzhou Bioer Technology, Hangzhou, Zhejiang, CHN).

Los amplicones fueron separados en gel de agarosa 1%, a 90 voltios por 35 a 45 min, teñido con Sybr® Safe DNA (Invitrogen™, Thermo Fisher).

#### 1.1.5 Estudio de casos naturales de campo asociados a *Campylobacter fetus* en bovinos

Se llevó a cabo la visita a 7 establecimientos de cría bovina de la provincia de Buenos Aires (**Tabla 1**) con diagnóstico de *C. fetus* de fetos abortados remitidos al SDVE del INTA EEA Balcarce. Se recolectaron un total de 53 muestras de MCV de vacas abortadas o vacías a la palpación transrectal para su análisis por IFD, cultivo bacteriológico, qPCR y mPCR (Capítulo 1; *Materiales y Métodos*). En las muestras

positivas tanto de MCV como feto se realizó el panel bioquímico descrito anteriormente para caracterizar subespecie (Capítulo 1; *Materiales y Métodos, Estudios y Técnica, Cultivo bacteriológico*).

**Tabla 1.** Establecimientos ganaderos de cría bovina (n=7) con problemas reproductivos asociados a abortos bovinos por *C. fetus*, durante el 2018 y 2019. Se realizó extracción de mucus cérvico vaginal (MCV) de hembras bovinas abortadas y recolección de fetos abortados.

Año	ID	Localidad	Muestras (n)	Antecedentes reproductivos
2018	1	Ayacucho	Feto (1) y MCV (8)	70% preñez y abortos.
	2	Coronel Vidal	Feto (1) y MCV (8)	71% de preñez
	3	Tandil	Feto (1) y MCV (10)	Abortos.
	4	Balcarce	Feto (1) y MCV (5)	Abortos.
	5	Tres Arroyos	MCV (12)	79% de preñez y abortos.
2019	6	Balcarce	Feto (2) y MCV (5)	80% de preñez.
	7	Balcarce	Feto (1) y MCV (5)	80% de preñez y abortos.

Con el fin de evaluar comparativamente la detección de *C. fetus* e identificación de subespecie mediante la técnica de mPCR (Iraola et al. 2012) contra la IFD y el cultivo bacteriológico, se analizaron muestras de líquido de abomaso y pulmón de 10 fetos bovinos abortados por *C. fetus* registrados por el SDVE EEA INTA Balcarce entre los años 2016 y 2019. Estas muestras se encontraban conservadas en freezer a -80°C hasta el momento del procesamiento (2 a 5 años).

Se utilizó un kit comercial (Inbio Highway®) como método de extracción de ADN para *C. fetus*, siguiendo las instrucciones de los fabricantes para muestras de líquido de abomaso (Inbio HighWay® DNA Puriprep-S kit), y para muestras de tejidos (pulmón) (Inbio HighWay® DNA Puriprep-T kit).

### 1.1.6 Análisis de los datos

El set de datos de las muestras fue evaluado mediante el Test de Concordancia y estimación del coeficiente Kappa (Thrusfield, 1995) para medir el grado de acuerdo entre los resultados de la detección de *C. fetus* con IFD, cultivo bacteriológico y qPCR tanto para muestras de MCV de las vaquillonas experimentalmente infectadas como de EP de los toros naturalmente infectados. La comparación entre tests diagnósticos (cultivo bacteriológico, IFD y qPCR) se llevó a cabo por el modelo lineal generalizado con distribución binomial utilizando el software estadístico Rcmdr (Littell et al. 1998). En los análisis, la categoría animal (toros y vaquillonas) fue considerada como variable independiente (categóricas) y el resultado del test diagnóstico utilizado una variable

dependiente. De los resultados de MCV, se aplicó la prueba chi cuadrado de Pearson para establecer la asociación entre variables. Se comparó la proporción de positivos observados entre técnicas diagnósticas (qPCR, cultivo e IFD) sobre el total de vaquillonas y por grupo de vaquillonas (Cff, Cfv y Cfi). Se consideró diferencia significativa a  $P < 0,05$ .

#### **1.1.7 Responsabilidades éticas**

Los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo al Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAE, INTA-CeRBAS, Argentina): Aval 163/2018.

## 1.2 RESULTADOS

### 1.2.1 Comparación de distintos métodos de extracción de ADN para detección de *C. fetus* por qPCR en mucus cérvico vaginal inoculado experimentalmente

El MCV es una muestra menos contaminada por otros componentes como sangre, células epiteliales, orina o heces, aunque su consistencia “viscosa” característica dificulta la manipulación óptima de las muestras para las técnicas diagnósticas; pudiendo provocar la pérdida de ADN con el sedimento cuando se preparan las muestras para qPCR. Teniendo en cuenta este punto, inicialmente se analizaron muestras de MCV inoculadas con diferentes concentraciones de la bacteria para validar el protocolo de qPCR a utilizar en muestras clínicas de vaquillonas experimentalmente infectadas.

Se llevaron a cabo tres tratamientos previos: homogenización mecánica, tratamiento con L-cisteína y sonicación); y luego se procedió con los dos métodos de extracción de ADN (in-house y comercial). En todas las muestras de MCV inoculadas *in vitro* se recuperó la cepa Cfv-97/608 mediante cultivo bacteriológico. La detección de *C. fetus* mediante qPCR resultó significativamente más sensible con el método de extracción de ADN con kit comercial con los tres tratamientos previos (homogenización mecánica, L-cisteína y sonicación) comparado al método in-house-LBT (IH-LBT) (**Tabla 2**). A su vez, la aplicación del kit comercial con homogenización mecánica resultó ligeramente más efectivo ( $10^4$  UFC) comparado con sonicación ( $10^5$  UFC) o utilización de L-cisteína ( $10^6$  UFC).

Con los resultados obtenidos, el método que contempla la extracción de ADN casera (IH-LBT) resultó menos sensible para el procesamiento de muestras clínicas de MCV. Por lo tanto, se sugiere la utilización de un kit comercial, con homogenización mecánica previa para la detección molecular del patógeno.

**Tabla 2.** Resultados positivos mediante qPCR de MCV inoculado *in vitro* con diluciones seriadas de  $10^8$  a  $10^2$  de *C. fetus* subsp. *venerealis*, con 3 formas de acción previa y 2 métodos de extracción de ADN.

Tratamiento	Método de extracción de ADN			
	In House-LBT	Rango Ct	Kit comercial	Rango Ct
Homogenización mecánica	$10^8$ a $10^7$	17.6-27.5	$10^8$ a $10^4$	15.5-29.48
L-cisteína	$10^8$ a $10^7$	18-28.75	$10^8$ a $10^6$	16.3-24.9
Sonicado	$10^8$	18.6	$10^8$ a $10^5$	17.3-28.25



Los controles negativos utilizados: *Campylobacter* non-fetus (*C. jejuni*, *C. sputorum* subsp. *bubulus*, *C. coli* y *C. hyointestinalis*) y otras bacterias non-*Campylobacter* (*Salmonella*, *Proteus spp.*, *Arcobacter sp.*, *Trueperella pyogenes*, *Pasteurella sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* y *E. coli*) resultaron negativas.

### 1.2.2 Evaluación de la infección experimental de vaquillonas con *Campylobacter fetus* mediante pruebas moleculares y convencionales

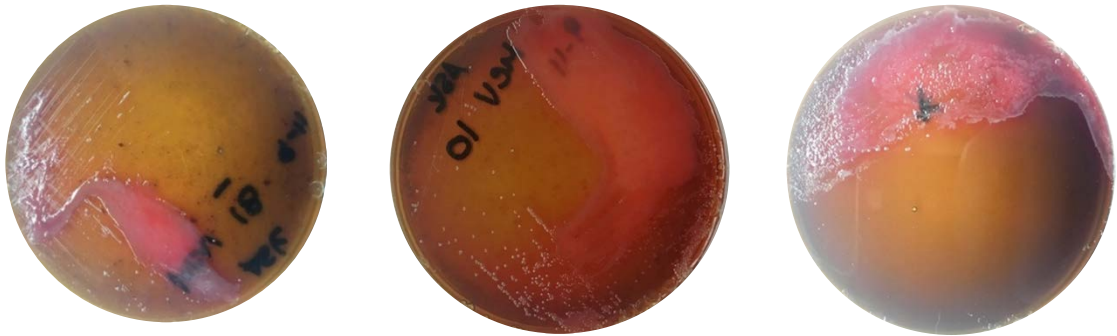
Tras la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF), tres vaquillonas del GT-Cff y una del GT-Cfvi lograron la preñez, mientras que por servicio natural otras dos del GT-Cff y otra del GT-Cfvi también se preñaron. Sin embargo, ninguna de las vaquillonas del GT-Cfv resultó preñada. En total 5/8 (62,5%) del grupo Cff y 2/8 (25%) del grupo Cfvi lograron preñez. De las siete vaquillonas preñadas, dos del GT-Cff se detectaron como abortadas tras diagnóstico de gestación por palpación transrectal al día 285, las cuales estaban preñadas al día 241. Ninguno de los fetos se pudo recuperar.

De los tres grupos de vaquillonas experimentalmente infectadas se recolectaron 240 muestras (24 animales por 10 muestreos) de MCV pos desafío experimental para detección de *C. fetus* mediante pruebas convencionales (cultivo bacteriológico e IFD). Se utilizaron 216 muestras de MCV para qPCR con dos métodos de extracción de ADN: IH-LBT (n=96) y kit comercial (n=216), con homogenización mecánica como tratamiento previo para comparar su eficacia. Las muestras se procesaron por pruebas moleculares entre 12 y 18 meses luego de extraídas, siendo conservadas a -80°C durante ese período.

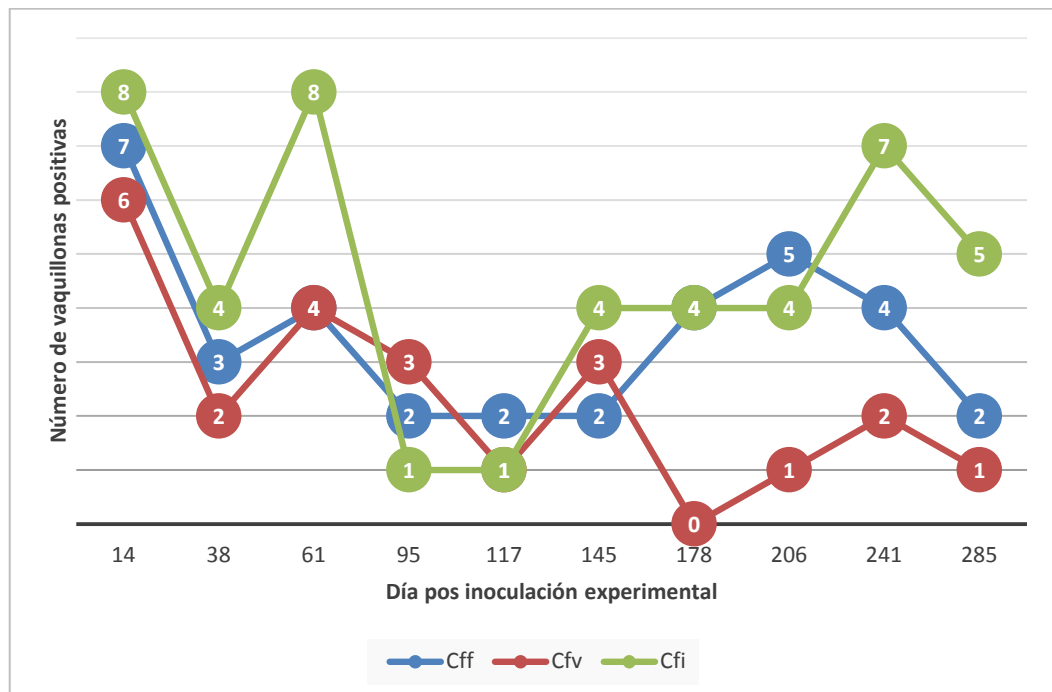
Tras el desafío experimental de las vaquillonas con la respectiva cepa de *C. fetus* (Cff, Cfv y Cfvi), se pudo demostrar por cultivo bacteriológico que un 87,5% (21/24) de las vaquillonas (día 14) resultaron infectadas (**Tabla 3 y Tabla complementaria 1**). En todos los grupos, al menos una vaquillona resultó infectada hasta el final del ensayo (285 días). Cinco de las vaquillonas del GT-Cfvi se mantuvieron infectadas hasta el final del ensayo, mientras para los GT-Cfv y -Cff solo 1 y 2, respectivamente.

Mediante cultivo bacteriológico resultaron positivas el 43,3% (104/240) de las muestras de MCV pos-desafío (**Fig. 6**). Los resultados separados por grupo experimental fueron de 43,75%, 28,75% y 57,5% de muestras positivas para Cff, Cfv y Cfvi, respectivamente, mostrando diferencia significativa ( $P=0,001$ ). Se destaca una baja en la recuperación de *C. fetus* del MCV de las vaquillonas entre los días 95 y 145

en todas las subespecies, posiblemente por eliminación del patógeno o variación en la concentración de la bacteria dificultando detección por cultivo bacteriológico (**Fig. 7**). Particularmente, los GT-Cff y -Cfv continuaron con una baja recuperación en sucesivos muestreos, lo cual sugiere la eliminación de *C. fetus* del tracto reproductor en esas hembras (infección autolimitante).



**Figura 6.** Muestras de MCV de tres vaquillonas experimentalmente infectadas, en agar Skirrow tras 48h de incubación en atmósfera microaerófila, con colonias compatibles con *C. fetus*. Notar coloración rojiza del material sembrado.



**Figura 7.** Esquema representativo de la dinámica de infección de *C. fetus* en cultivo bacteriológico apartir de mucus cérvico vaginal de 24 vaquillonas experimentalmente infectadas con distintas cepas (Cff, Cfv y Cfi; 8 por grupo). Cff: *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*; Cfv: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*; Cfi: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* biovar *intermedius*.

Las mismas muestras fueron procesadas por IFD con excepción de las correspondientes al día 14. El 23,75% (57/216) de las muestras resultaron positivas (**Tabla 3 y Tabla complementaria 1**). El análisis según subespecie resultó en un 19,4%, 15,3% y 44% de vaquillonas positivas para las subespecies Cff, Cfv y Cfvi, respectivamente. Al igual que lo observado con el cultivo, se observa una marcada eliminación de *C. fetus* especialmente en los GT-Cff y -Cfv (**Tabla 3**).

El índice de concordancia de Kappa entre el cultivo bacteriológico e IFD para las muestras de MCV fue moderado (0,543; IC: 0,422-0,663), resultando muchas muestras positivas por cultivo (n=35) no detectables por IFD. Esto evidenció la mayor detección de *C. fetus* mediante cultivo ( $P=0,001$ ).

Para la qPCR el punto de corte (umbral de ciclos; Ct) para definir una muestra positiva fue de  $\leq 32$ , obteniendo un rango de 22 a 32 de las muestras procesadas. La tasa de detección de *C. fetus* entre los métodos de extracción de ADN fue considerablemente mejor con el kit comercial con un 29% (62/216) contra solo el 8% (8/96) por el protocolo casero IH-LBT ( $P=0,8$ ) (**Tabla 3 y Tabla complementaria 1**). Se pudo observar más muestras positivas con qPCR, utilizando kit comercial como método de extracción, de los GT-Cff y -Cfvi (31% y 39%, respectivamente), en comparación con el GT-Cfv (17%) ( $P=0,012$ ).

Particularmente, cuando se comparan los mismos períodos de muestreo, la eficiencia del protocolo cuando se emplea extracción con kit comercial resulta aún mayor (34%; 33/96) que la de la extracción por IH-LBT. La curva estándar determinada que muestra el logaritmo de los números de copias resultó en una fuerte correlación lineal (pendiente: -3,991, Eff%: 100% y  $R^2=0,993$ ). El coeficiente de concordancia Kappa entre ambos métodos de extracción de ADN para muestras de MCV por qPCR fue pobre (0,127; IC: -0,126-0,380). Al igual que el procesamiento de muestras de EP, la diferencia a favor del kit comercial es considerablemente superior, siendo la utilización de método IH-LBT mediante lisis por calor no adecuada para su uso en muestras clínicas de MCV.

Por otro lado, la concordancia entre el cultivo bacteriológico y la qPCR (kit comercial) también resultó débil (0,35; IC: 0,229-0,483). Este último mostró 53 muestras positivas a cultivo y negativas a qPCR, y por otro lado, 15 muestras positivas por qPCR no detectadas por cultivo bacteriológico, lo que resultó en la baja concordancia entre pruebas ( $P=0,001$ ). Esto evidencia la posibilidad de obtener falsos negativos al utilizar una sola prueba. Respecto a la técnica de IFD, resultó significativamente mejor la detección mediante qPCR con kit ( $P=0,001$ )

En la evaluación de las pruebas convencionales (cultivo e IFD) y la qPCR con extracción de ADN mediante kit comercial ( $P=0,001$ ), resultó con una mayor detección por parte del cultivo, considerada la técnica *gold estándar*, seguido de qPCR e IFD. Sin embargo, el grado de concordancia entre las técnicas fue débil (coeficiente kappa de 0,35 y 0,376 para qPCR/cultivo y qPCR/IFD, respectivamente). El cultivo es la técnica *gold estándar*, y a pesar de ser laboriosa y de consumir mucho tiempo, resultó la más eficaz. Por lo tanto, es necesario optimizar aún más los métodos de procesamiento de muestras que permitan exponer la bacteria y obtener su ADN para mejorar la eficacia de detección de *C. fetus* mediante IFD y la qPCR.

**Tabla 3.** Resultados positivos obtenidos mediante cultivo bacteriológico (n=240), IFD (n=216) y qPCR con extracción de ADN con kit comercial (n=216) y con método In-house (n=96) a partir de muestras de mucus cérvico-vaginal de 24 vaquillonas experimentalmente infectadas con distintas cepas (Cff, Cfv y Cfvi) (8 por grupo).

Día pos-inoculación experimental		Cff	Cfv	Cfvi	Total muestras positivas
14	Cultivo	7	6	8	21
	qPCR Kit	4	2	5	11
	qPCR In-house	1	0	4	5
38	Cultivo	3	2	4	9
	IFD	2	0	6	8
	qPCR Kit	4	2	4	10
61	Cultivo	4	4	8	16
	IFD	1	4	5	10
	qPCR Kit	3	3	4	10
95	qPCR In-house	0	1	0	1
	Cultivo	2	3	1	6
	IFD	0	1	1	2
117	qPCR Kit	2	1	1	4
	Cultivo	2	1	1	4
	IFD	2	1	2	5
145	Cultivo	2	3	4	9
	IFD	0	1	2	3
	qPCR Kit	3	0	3	6
178	qPCR In-house	0	0	1	1
	Cultivo	4	0	4	8
	IFD	3	1	1	5
206	qPCR Kit	2	0	2	4
	Cultivo	5	1	4	10
	IFD	3	1	5	9
241	qPCR Kit	2	2	2	6
	Cultivo	4	2	7	13
	IFD	3	1	7	11
285	qPCR Kit	2	0	3	5
	Cultivo	2	1	5	8
	IFD	0	1	3	4
	qPCR Kit	0	2	4	6
	qPCR In-house	1	0	0	1
	Total muestras positivas/Total	Cultivo 35/80	23/80	46/80	104/240
	IFD 14/72	11/72	32/72	57/216	
	qPCR Kit 22/72	12/72	28/72	62/216	
	qPCR In-house 2/32	1/32	5/32	8/96	

IFD: inmunofluorescencia directa. Cff: *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*; Cfv: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. Cfvi: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* biovar *intermedius*.

Como prueba de concepto, evaluamos la incorporación de un control endógeno que permita detectar muestras con bajo contenido de ADN o inhibidas. Con este fin se seleccionó como blanco el gen bovino GAPDH. Este ensayo se realizó sobre 24 muestras de MCV. El 58% (14/24) de estas muestras fueron positivas al ensayo de qPCR para el gen GAPDH (Cts<32) correspondiendo 7 a cada método de extracción (kit comercial e In-house, respectivamente) (**Tabla 4**). De esas 14 muestras positivas a GAPDH, 9 resultaron positivas a la detección de *C. fetus* por qPCR (7 por extracción con kit comercial). Mientras de las 10 muestras donde GAPDH fue negativo, 3 resultaron positivas a *C. fetus* por qPCR. Las muestras negativas al control endógeno indican baja calidad de ADN y/o contaminación que influye en el resultado de la posterior qPCR con posibles falsos-negativos en muestras de MCV, particularmente mediante el método de extracción In-house, que deberían repetirse.

**Tabla 4.** Resultados obtenidos de qPCR para gen endógeno (GAPDH) a partir de muestras de mucus cérvico vaginal de vaquillonas experimentalmente infectadas con distintas cepas (Cff, Cfv y Cfvi) y comparación con qPCR para detección de *C. fetus*.

ID		Día pos inoculación	Método de extracción de ADN	qPCR GAPDH (Cts)	qPCR*
1	Cff	14	Kit	+(26,5)	+
2	Cff	14	Kit	+(28)	+
2	Cff	14	IH	-	-
2	Cff	206	Kit	+(25)	+
3	Cff	285	IH	-	-
5	Cff	241	IH	-	-
6	Cff	206	Kit	+(26,5)	+
8	Cff	14	IH	+(26)	-
8	Cff	61	Kit	+(26)	+
2	Cfv	285	IH	+(27)	-
7	Cfv	285	Kit	-	-
8	Cfv	14	Kit	-	+
8	Cfv	61	IH	-	+
1	Cfvi	14	IH	-	-
1	Cfvi	38	IH	+(30)	-
2	Cfvi	14	Kit	-	+
2	Cfvi	14	IH	+(26)	+
2	Cfvi	38	IH	+(27)	-
2	Cfvi	95	Kit	+(23,5)	+
3	Cfvi	38	IH	+(26)	+
3	Cfvi	61	Kit	+(28)	+
5	Cfvi	145	IH	-	-
6	Cfvi	95	Kit	-	-
6	Cfvi	241	IH	+(26)	-

kit: kit comercial; ih: In-house Cff: *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*; Cfv: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*; Cfvi: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* biovar *intermedius*.

\*Protocolo de qPCR descrito por Iraola et al. (2016).

Se realizó un protocolo previo con el objetivo de cambiar la viscosidad del MCV en 15 muestras de MCV para permitir el adecuado procesamiento para su extracción de ADN y posterior detección de *C. fetus* mediante PCR. En las 15 muestras se detectó *C. fetus* al cultivo bacteriológico. En el 67% (10/15) de las muestras se detectó *C. fetus*

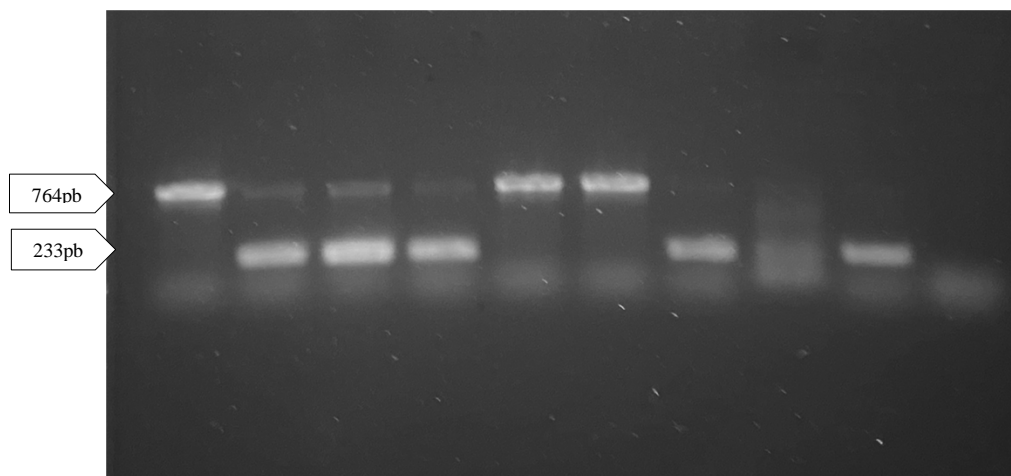
mediante qPCR. Esto muestra una mejoría en la eficiencia en la extracción de ADN en MCV comparado con la utilización solo de kit comercial teniendo en cuenta detección con qPCR (48%; 49 muestras positivas por qPCR sobre 102 muestras positivas al cultivo bacteriológico). Aunque más muestras deben ser procesadas para arribar a una conclusión significativa, este protocolo evidencia un alto potencial para el procesamiento de muestras de MCV mediante pruebas moleculares para detección de *C. fetus* u otros patógenos.

Con el objetivo de evaluar la detección de *C. fetus* y la posible discriminación de subespecies mediante mPCR en muestras conocidas se analizaron 17 muestras clínicas de MCV y 9 colonias aisladas de las vaquillonas infectadas comprendiendo los 3 grupos (Cff, Cfv y Cfvi) (**Tabla 5 y Figura 8**). Las muestras conocidas como Cfvi son identificadas por la mPCR como Cfv ya que producen el mismo amplicón. En las colonias fue consistente el resultado de mPCR con la cepa actuante. Por otro lado, con las muestras clínicas, solo se detectaron 10 (59%; 10/17) muestras como positivas, de las cuales hubo coincidencia en 8/10 entre la mPCR y la cepa ya conocida. Particularmente, la inconsistencia en muestras clínicas conocidas se dió con Cff donde la mPCR las identificó como Cfv. Con el cultivo bacteriológico se detectaron 4 muestras más como positivas a *C. fetus*. Estas incongruencias en la discriminación de subespecie indicarían que el protocolo utilizado no es adecuado para tal fin o deben interpretarse los resultados con cautela ya que la sensibilidad de cada amplificación puede estar muy condicionada a la presencia de inhibidores en cada muestra.

**Tabla 5.** Resultados de mPCR para discriminación de subespecie de *C. fetus* de 17 muestras clínicas de MCV y 9 colonias aisladas de vaquillonas experimentalmente infectados con Cff, Cfv y Cfvi, respectivamente.

Grupo experimental	ID		Extracción de ADN	Muestra	mPCR	Cultivo bacteriológico
	Vaquillona	Día				
Cff	2	146	Kit	Colonia	Cff	Cff
Cff	1	178	Kit	Colonia	Cff	Cff
Cff	3	178	Kit	Colonia	Cff	Cff
Cfv	2	285	Kit	Colonia	Cfv	Cfv
Cfv	3	145	Kit	Colonia	Cfv	Cfv
Cfv	8	14	Kit	Colonia	Cfv	Cfv
Cfvi	5	285	Kit	Colonia	Cfv	Cfvi
Cfvi	3	178	Kit	Colonia	Cfv	Cfvi
Cfvi	3	61	Kit	Colonia	Cfv	Cfvi
Cff	5	14	Kit	MCV	Cfv	Cff
Cff	7	14	Kit	MCV	Negativo	Negativo
Cff	3	14	Kit	MCV	Cff	Cff
Cff	8	14	Kit	MCV	Cff	Cff
Cff	6	14	Kit	MCV	Cfv	Cff
Cff	2	206	Kit	MCV	Negativo	Cff
Cfv	8	14	Kit	MCV	Cfv	Cfv
Cfv	6	14	Kit	MCV	Negativo	Negativo
Cfv	7	14	Kit	MCV	Cfv	Cfv
Cfv	5	14	Kit	MCV	Cfv	Cfv
Cfv	7	285	Kit	MCV	Cfv	Cfv
Cfv	1	38	ih	MCV	Negativo	Negativo
Cfvi	2	14	Kit	MCV	Cfv	Cfvi
Cfvi	3	61	Kit	MCV	Negativo	Cfvi
Cfvi	4	14	Kit	MCV	Negativo	Cfvi
Cfvi	5	14	Kit	MCV	Negativo	Cfvi
Cfvi	7	14	Kit	MCV	Cfv	Cfvi

kit: kit comercial; ih: In-house. Cff: *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*; Cfv: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*; Cfvi: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* biovar *intermedius*.



**Figura 8.** PCR multiplex para detección de *C. fetus* y diferenciación de subespecie de muestras de mucus cérvico vaginal (MCV). Electroforesis representativa en gel de agarosa al 1%. Pocillo 1: control positivo Cff, pocillo 2: control positivo Cfv, pocillo 3: MCV 7 día 114, pocillo 4: MCV 7 día 14, pocillo 5: MCV 3 día 14, pocillo 6: MCV 8 día 14, pocillo 7: MCV 2 día 14, pocillo 8: MCV 3 día 61, pocillo 9: MCV 5 día 14, pocillo 10: control negativo (mix sin templado). *C. fetus*: 764 pb; *Cfv*: 233 pb (Iraola et al. 2012).

La principal vía de afección del tracto reproductor es vía ascendente por vagina, sin embargo, con la subespecie Cff se sugiere una posible bacteriemia y posterior infección fetal. Esto está bien esclarecido en humanos y en animales infectados con otras especies de *Campylobacter*. Sin embargo, en bovinos no se ha estudiado esta posibilidad. Ante esto, se analizaron muestras de sangre mediante qPCR y cultivo bacteriológico en las 24 vaquillonas en 4 períodos para evaluar posible bacteriemia. Todas las muestras analizadas resultaron negativas (no mostrado).

### **1.2.3 Evaluación de toros naturalmente desafiados con *Campylobacter fetus*: detección de *C. fetus* mediante pruebas moleculares y convencionales**

En base a los resultados de las pruebas convencionales (cultivo e IFD) y moleculares (qPCR), los tres toros expuestos a las vaquillonas experimentalmente desafiadas resultaron infectados con su respectiva cepa (Cff, Cfv o Cfvi) tras el servicio natural de 39 días. La infección se mantuvo persistente a lo largo de todo el ensayo en los Toros-Cfv y -Cfvi, mientras el Toro-Cff resultó infectado hasta al menos 145 días.

Un total de 27 muestras de esmegma prepucial (EP) pos-servicio fueron recolectadas por aspiración, correspondiendo a 9 muestreos por cada uno de los 3 toros, posteriormente analizados mediante cultivo bacteriológico e IFD (**Tabla 5**).

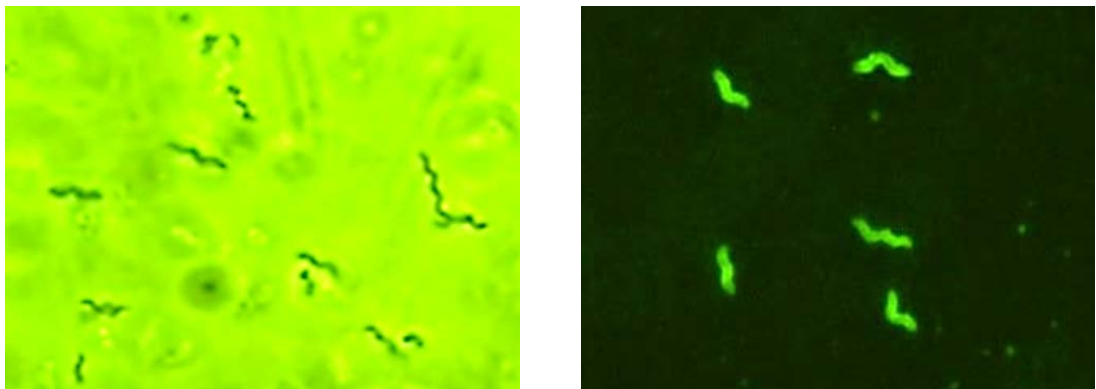
Mediante cultivo bacteriológico resultaron positivas el 66,6% de las 27 muestras de EP pos-servicio (**Tabla 5**) (**Fig. 9 y 10**). Al realizar el análisis por cada toro, se pudo observar que hubo más muestras positivas provenientes del Toro-Cfv (89%) y del Toro-Cfvi (67%), con diferencia significativa respecto al Toro-Cff (44%) ( $P=0,011$ ).





**Figura 9.** Muestra de esmegma prepucial de toro. Placa de agar Skirrow con colonias compatibles con *C. fetus*.

Por otro lado, mediante IFD el 63% de las 27 muestras analizadas resultaron positivas (**Tabla 5**) (**Fig. 10**). En cuanto al análisis por animal, casi todas las muestras del Toro-Cfvi resultaron positivas (89%), mientras cerca de la mitad de las muestras del Toro-Cfv (55,5%) y -Cff (44%) fueron identificadas como positivas. Al igual que con la técnica de cultivo, en este caso también hubo diferencias significativas ( $P=0,006$ ) entre las muestras positivas del toro infectado con Cfvi y aquellas de los toros infectados con las otras dos subespecies (-Cfv y -Cff).

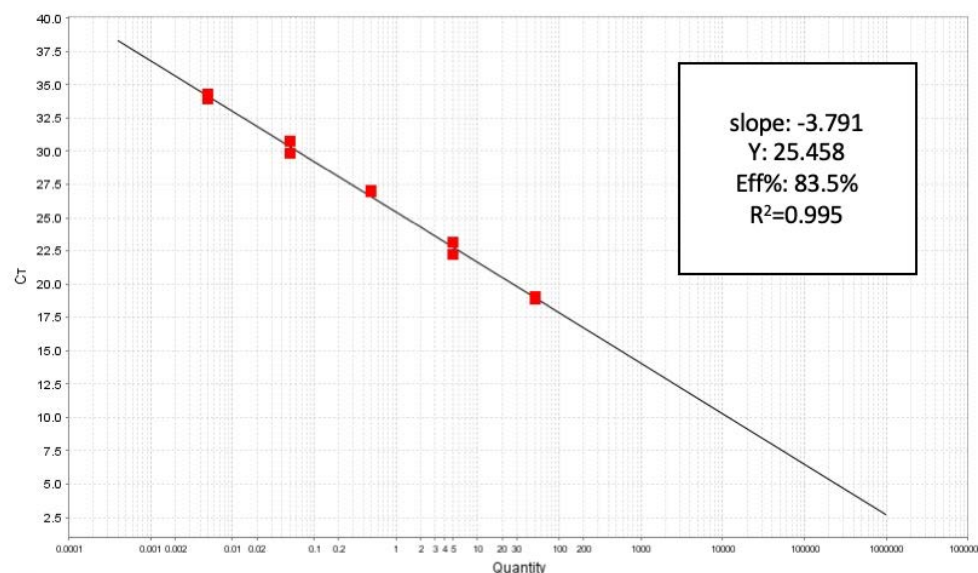


**Figura 10.** Colonias de *Campylobacter fetus* spp. de esmegma prepucial del Toro-Cfv (día 104) observadas en microscopio de contraste de fases con morfología de espirilo (izquierda) e inmunofluorescencia directa anti-*Campylobacter fetus* con morfología característica de bacilo (espirilos, formas "S" y formas gaviota) y fluorescencia periférica intensa (derecha) con microscopio epifluorescente. Objetivo de inmersión en aceite, 1000x.

En estas muestras, no se obtuvieron diferencias significativas entre la técnica de cultivo bacteriológico e IFD ( $P=0.635$ ). A su vez, el índice de concordancia de Kappa entre ambas técnicas convencionales para las muestras de EP de los toros resultó buena (kappa index: 0,658; IC: 0,384-0,932).

La evaluación de la detección de *C. fetus* en las muestras de EP por qPCR se llevó a cabo en 24 muestras. Por problemas de logística, en el día 262 no se recolectaron muestras para diagnóstico molecular. En cada una de las muestras se usaron dos métodos de extracción de ADN (IH-LBT y kit comercial).

La curva estándar determinada que muestra el logaritmo de los números de copias resultó en una fuerte correlación lineal (pendiente: -3,791, Eff%: 83,5% y  $R^2=0,995$ ) (**Fig. 11**). Se definió como punto de corte (umbral de ciclos; Ct) para definir una muestra positiva  $\leq 35$  (**Tabla 5**) (Delpiazzo et al. 2021).



**Figura 11.** Curva estándar de PCR en tiempo real con sonda TaqMan-MGB para detección de *C. fetus*. Rango de concentración de ADN de 50 pg/μL a 5 fg/μL. Se detallan el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), la eficiencia de amplificación (Eff%), la pendiente y el intercepto (Y).

Para qPCR, un 75% (18/24) y 66,6% (16/24) de las muestras resultaron positivas por el método de extracción de ADN IH-LBT y el kit comercial, respectivamente (**Tabla 6**). En cuanto a las subespecies venéreas (Cfv y Cfvi), el 87,5% (14/16) y 81% (13/16) de las muestras fueron identificadas como positivas por los métodos de extracción de ADN IH-LBT y kit comercial, respectivamente. El análisis estadístico no arrojó diferencias significativas entre los distintos métodos de extracción para este tipo de muestras ( $P>0,05$ ).

**Tabla 6.** Resultados positivos de cultivo bacteriológico e IFD de 27 muestras de esmegma prepucial de 3 toros (Cff, Cfv y Cfvi).

Días pos-inoculación experimental		Toro-Cff	Toro-Cfv	Toro-Cfvi	Total muestras positivas
52	Cultivo	+	+	-	2
	IFD	+	-	+	2
	qPCR IH (Cts)	+ (25,6)	-	+ (23,8)	2
	qPCR kit (Cts)	+ (29,1)	-	+ (23,1)	2
95	Cultivo	+	+	+	3
	IFD	+	-	+	2
	qPCR IH (Cts)	+ (32,7)	+ (31,6)	+ (30,6)	3
	qPCR kit (Cts)	-	-	-	0
117	Cultivo	+	+	+	3
	IFD	+	+	+	3
	qPCR IH (Cts)	+ (28,9)	+ (30)	+ (29,8)	3
	qPCR kit (Cts)	+ (30,4)	+ (30)	+ (31,8)	3
145	Cultivo	+	-	+	2
	IFD	+	+	+	3
	qPCR IH (Cts)	+ (28,4)	-	+ (29,1)	2
	qPCR kit (Cts)	+ (26,3)	+ (31,5)	+ (27,1)	3
178	Cultivo	-	+	+	2
	IFD	-	+	+	2
	qPCR IH (Cts)	-	+ (29)	+ (27,9)	2
	qPCR kit (Cts)	-	+ (28)	+ (27,3)	2
206	Cultivo	-	-	+	1
	IFD	-	-	-	0
	qPCR IH (Cts)	-	+ (30,3)	+ (33)	2
	qPCR kit (Cts)	-	+ (29)	+ (32,4)	2
241	Cultivo	-	-	+	1
	IFD	-	-	+	1
	qPCR IH (Cts)	-	+ (32,1)	+ (32,7)	2
	qPCR kit (Cts)	-	+ (31,2)	+ (27,8)	2
262	Cultivo	-	+	+	2
	IFD	-	+	+	2
283	Cultivo	-	+	+	2
	IFD	-	+	+	2
	qPCR IH (Cts)	-	+ (32)	+ (28,8)	2
	qPCR kit (Cts)	-	+ (31,4)	+ (28,8)	2
Total muestras positivas/Total	Cultivo	4/9	6/9	8/9	18/27
	IFD	4/9	5/9	8/9	17/27
	qPCR IH	4/8	6/8	8/8	18/24
	qPCR kit	3/8	6/8	7/8	16/24

+: positivo; -: negativo. IFD: inmunofluorescencia directa; IH: método extracción ADN In-house LBT; kit: método extracción ADN kit comercial. Cff: *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*; Cfv: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. Cfvi: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* biovar *intermedius*.

El coeficiente de concordancia Kappa entre los métodos de extracción de ADN utilizados para el protocolo de qPCR para las muestras de esmegma prepucial fue bueno (índice kappa: 0,77; IC: 0,562-0,982). Por otro lado, la concordancia entre IFD y qPCR (IH-LBT de extracción de ADN) para muestras de EP también fue bueno (kappa index: 0,769; IC: 0,523-0,1.105). Sin embargo, la concordancia entre el cultivo bacteriológico y qPCR (IH-LBT de extracción de ADN) para el análisis de muestras de esmegma prepucial fue moderada (índice kappa: 0,599; IC: 0,282-0,916).

En cuanto a la eficiencia de las tres pruebas diagnósticas, convencionales (IFD y cultivo bacteriológico) y moleculares (qPCR), no hubo diferencias significativas entre ellas ( $P=0,726$ ). Las concordancias resultaron moderadas a buenas resultando adecuado el uso de cualquiera de estas técnicas como única.

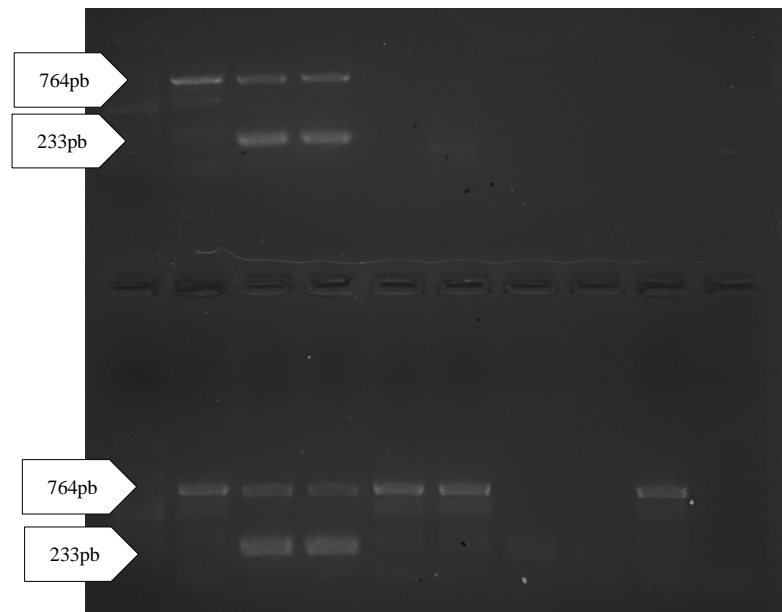
Al igual que con muestras de MCV se evaluó mediante el gen GAPDH la calidad de ADN extraído de 10 muestras de EP. El 70% (7/10) fueron positivas mediante qPCR al gen endógeno (GAPDH) ( $C_t < 32$ ), correspondiendo 4 al método de extracción con kit comercial y 3 al método In-house. Seis de esas 7 muestras positivas a GAPDH resultaron positivas a la detección de *C. fetus* por qPCR (4 por el método de extracción con kit comercial). Mientras de las 3 muestras donde GAPDH fue negativo, solo una fue positiva a *C. fetus* por qPCR. Aunque el "n" es limitado se observa una tendencia favorable en cuanto al uso de control endógeno como indicador de métodos de extracción adecuados para los protocolos de qPCR para detección de *C. fetus* utilizados en este trabajo.

De algunas de las muestras clínicas ( $n=12$ ) y colonias ( $n=9$ ) aisladas a partir del cultivo de EP de los 3 toros se realizó mPCR para evaluar detección de *C. fetus* y posible diferenciación de subespecies (**Fig. 12**). La tipificación por mPCR coincidió con la identidad de la cepa utilizada en cada grupo correspondiente, en las 9 colonias aisladas de EP de los tres toros (**Tabla 7**). En cuanto a las muestras clínicas ( $n=12$ ), la tasa de detección resultó baja (58%, 7/12) junto a una débil concordancia con el cultivo (kappa index: 0,438; IC: -0,114-0,989). Estas últimas, al igual que con las colonias en las que se detectó *C. fetus*, la subespecie identificada correspondió con la cepa actuante.

**Tabla 7.** Resultados de PCR multiplex para la detección y tipificación de *C. fetus* en 12 muestras clínicas de esmegma prepucial y 9 colonias aisladas de toros naturalmente infectados.

Toro	ID*		Muestra	mPCR	Cultivo bacteriológico
	Día	Extracción de ADN			
Cfv	145	Kit	Colonia	Cfv	Cfv
Cfv	206	Kit	Colonia	Cfv	Cfv
Cfv	283	Kit	Colonia	Cfv	Cfv
Cff	52	Kit	Colonia	Cff	Cff
Cff	145	Kit	Colonia	Cff	Cff
Cff	206	Kit	Colonia	Cff	Cff
Cfvi	145	Kit	Colonia	Cfv	Cfvi
Cfvi	178	Kit	Colonia	Cfv	Cfvi
Cfvi	262	Kit	Colonia	Cfv	Cfvi
Cfv	52	Ih	EP	Negativo	Negativo
Cfv	95	Ih	EP	Cfv	Cfv
Cfv	117	Kit	EP	Cfv	Cfv
Cfv	178	Ih	EP	Cfv	Cfv
Cfv	206	Ih	EP	Negativo	Cfv
Cff	52	Kit	EP	Cff	Cff
Cff	117	Ih	EP	Cff	Cff
Cff	145	Ih	EP	Cff	Cff
Cff	245	Ih	EP	Negativo	Negativo
Cfvi	52	Ih	EP	Negativo	Cfvi
Cfvi	95	Ih	EP	Negativo	Cfvi
Cfvi	117	Kit	EP	Cfv	Cfvi

kit: kit comercial; ih: In-house. EP: esmegma prepucial; Cff: *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*; Cfv: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*.



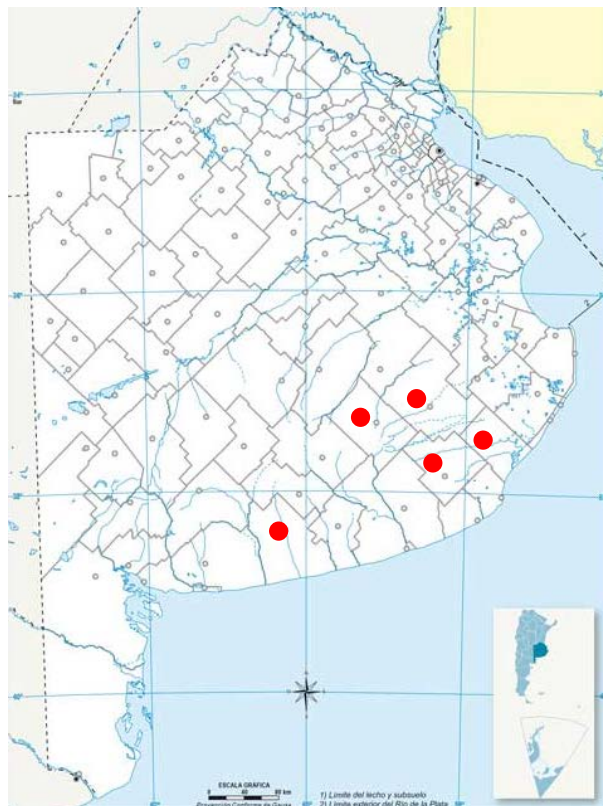
**Figura 12.** PCR multiplex para detección de *C. fetus* y diferenciación de subespecie de colonias aisladas y muestra clínica de esmegma prepucial (EP) de toro. Electroforesis representativa en gel de agarosa al 1%. Pocillo 2: control positivo Cff, pocillo 3: control positivo cfv, pocillo 4: colonia toro 3 (día 262). Pocillo 12: EP toro 2 (día 52), pocillo 13: EP toro 1 (día 95 h), pocillo 14: EP toro 3 (día 117), pocillo 15: EP toro 2 (día 117), pocillo 16: colonia toro 2 (día 145), pocillo 19: colonia EP de toro 2 (día 117), pocillo 20: control negativo (mix sin templado). *C. fetus*: 764 pb; *Cfv*: 233 pb (Iraola et al. 2012).

Al igual que en las vaquillonas, las muestras de sangre de estos animales resultaron negativas por cultivo y por qPCR. Esto podría sugerir que *C. fetus* solo genera una infección local a nivel del tracto genital del toro sin pasaje a vía sanguínea.

Los toros del grupo control resultaron negativos durante todo el ensayo experimental mediante todas las pruebas diagnósticas evaluadas.

#### 1.2.4 Estudio de establecimientos bovinos con infección endémica de *Campylobacter fetus* mediante pruebas moleculares y convencionales: Análisis de muestras de fetos y mucus cérvico vaginal

Durante los años 2018 y 2019 se visitaron siete establecimientos ganaderos de la provincia de Buenos Aires (**Fig. 13**) con problemas reproductivos asociados a abortos por *C. fetus*, diagnosticados en el SDVE INTA EEA Balcarce. Se recolectaron un total de 53 muestras de MCV correspondientes a vacas abortadas. En 6 de los 7 establecimientos se realizó el diagnóstico de rutina del feto con diagnóstico final de *C. fetus*.



**Figura 13.** Mapa de la provincia de Buenos Aires con partidos donde se ubican los establecimientos ganaderos visitados (punto rojo) con problemas reproductivos asociados a *C. fetus*: Balcarce (3), Ayacucho (1), Tres Arroyos (1), Mar Chiquita (1) y Tandil (1).

De las 53 muestras de MCV el cultivo resultó en mayor detección (7) seguido de qPCR (n=4) e IFD (n=3) (**Tabla 8**). En 4 de los establecimientos se detectó al menos una vaca positiva a *C. fetus*. En un establecimiento (18330) en el cual no se pudo recuperar fetos abortados se detectó la presencia de *C. fetus* en al menos un animal. El momento del muestreo de las vaquillonas fue de 2 a 6 meses posteriores a detectadas las pérdidas lo que pudo influir en la detección de *C. fetus* al momento de análisis de MCV, siendo que varía la concentración de la bacteria o incluso pudo eliminar el mismo. En uno de los establecimientos (ID 5) en una muestra de MCV la mPCR identificó la subespecie Cfv mientras por las pruebas bioquímicas se identificó Cff, coincidiendo esta última con la cepa aislada del feto abortado de ese establecimiento. De forma similar, en otro establecimiento (ID 6) hubo diferencia entre las cepas detectadas de MCV, por mPCR y pruebas bioquímicas (Cfv), respecto a la cepa identificada en el feto (Cff). Al tratarse de cepas desconocidas la falla pudo estar en la discriminación ya sea por mPCR o por pruebas bioquímicas o puede existir la participación de más de una cepa (co-infección).

**Tabla 8.** Establecimientos ganaderos (n=7) con problemas reproductivos asociados a abortos bovinos por *C. fetus*, durante el 2018 y 2019.

ID	Muestra (n)	Resultados positivos a <i>C. fetus</i> del MCV			Pruebas fenotípicas de MCV	mPCR de MCV	Pruebas fenotípicas (feto)
		Cultivo	IFD	qPCR (Cts)			
1	MCV (8)	0	0	0	NP	NP	Cff
2	MCV (8)	2	0	0	Cff	0	Cff
3	MCV (10)	0	0	0	NP	NP	Cff
4	MCV (12)	1	0	0	Cff	0	NP
5	MCV (5)	2	1	1 (23,9)	Cff	Cfv*	Cff
6	MCV (5)	2	2	3 (23,3-25,1)	Cfvi	Cfv*	Cff
7	MCV (5)	0	0	0	NP	NP	Cff
Total		7	3	4		2	

NP: no procesado, PCRm: PCR multiplex.

\*Solo 1 muestra de MCV resultó positiva

Cff: *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*; Cfv: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*; Cfvi: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* biovar. *intermedius*.

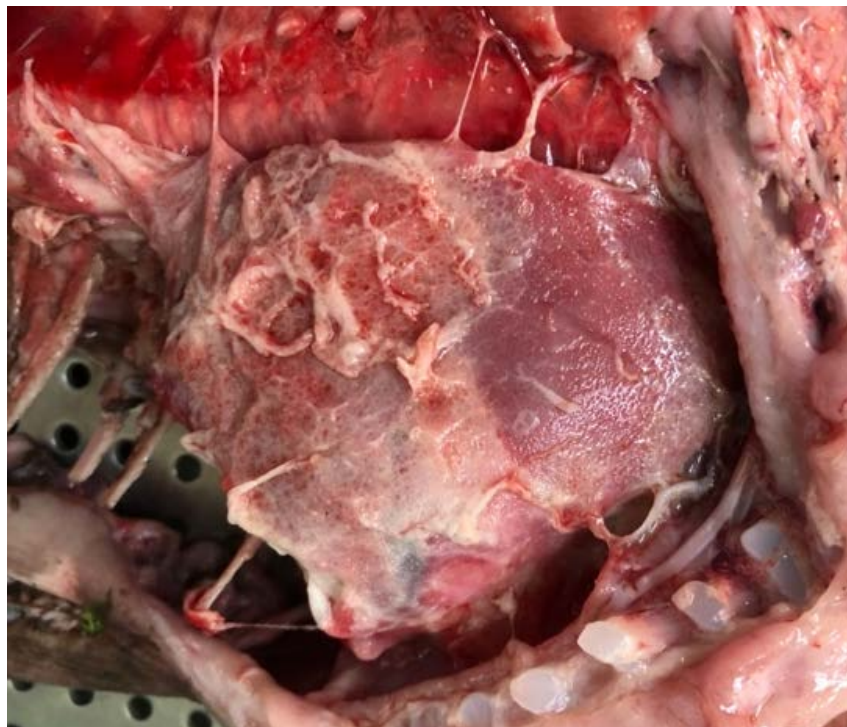
La edad gestacional de los fetos bovinos abortados analizados fue de un promedio de 6 meses (**Figura 14**), siendo dos del 3er trimestre y los restantes cuatro del 2do trimestre de gestación.





**Figura 14.** Feto bovino, raza cruzada, 150 días de gestación (ID 7).

En el líquido de abomaso y pulmón de todos los fetos se detectó *C. fetus* por cultivo bacteriológico e IFD. Mediante pruebas bioquímicas se caracterizaron fenotípicamente los seis fetos como Cff. En solo dos de los seis fetos se observaron hallazgos macroscópicos caracterizados por pleuritis y pericarditis fibrinosa difusa severa (**Fig. 15**). Cuatro de los fetos presentaron abundante líquido serosanguinolento en cavidad abdominal y/o torácica compatibles con distinto grado de autólisis.



**Figura 15.** Cavidad torácica, feto bovino (ID 7). Se observa pleuritis y pericarditis fibrinosa difusa severa con adherencias a parrilla costal (parte superior de la imagen).

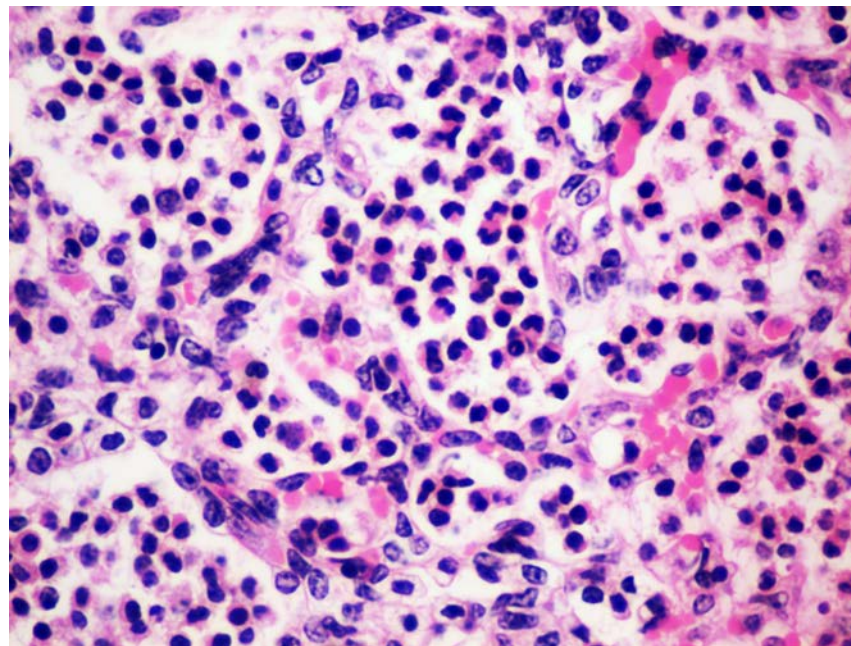


Microscópicamente, el órgano más afectado resultó el pulmón (5/6), seguido del hígado (4/6), corazón (3/6) y sistema nervioso central (3/6). En los pulmones, la lesión más característica era una bronconeumonía supurativa (**Fig. 16**), con un infiltrado principalmente compuesto por neutrófilos y macrófagos en espacio alveolar y lumen de bronquios y bronquiolos, y ocasionalmente linfocitos, de distribución difusa, moderada a severa, raramente con presencia de meconio (2/6) o edema (1/6) intra-alveolar.

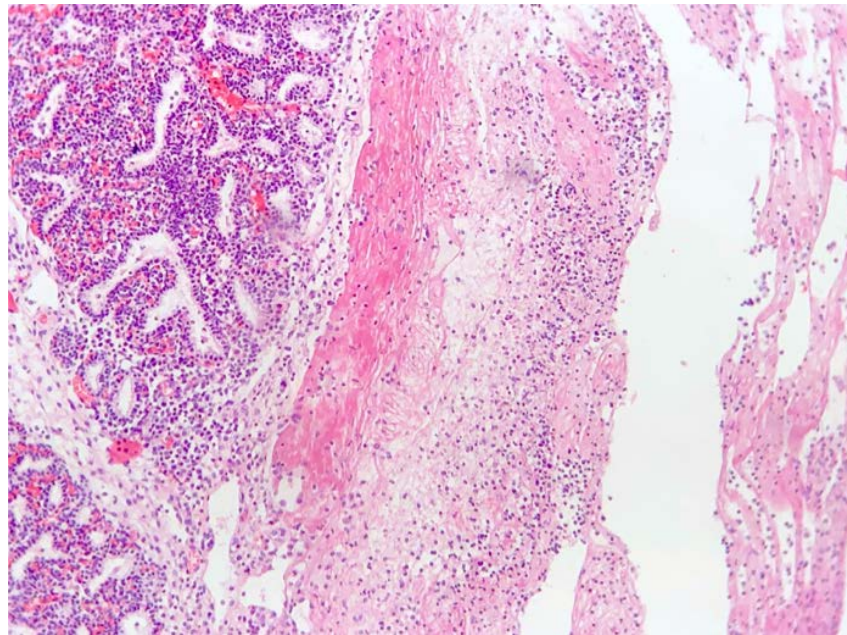
En dos fetos se observó pleuritis fibrinosa difusa marcada con neutrófilos y linfocitos viables y degenerados (**Fig. 17**). En SNC, la lesión se presentaba en las meninges de la corteza cerebral principalmente con infiltrado linfohistiocítico difuso leve a moderado.

En otro feto se observó miocarditis intersticial y epicarditis/pericarditis difusa linfohistiocítica leve a moderada, mientras en otros dos había miocarditis intersticial leve y pericarditis fibrinosa difusa severa, respectivamente.

Otro hallazgo frecuente fue hepatitis periportal linfoplasmocítica (4/6), mientras solo un feto presentó hepatitis necrotizante multifocal aleatoria con escasos macrófagos. Raramente se observó infiltrado linfocítico, plasmocítico e histiocítico en lámina propia y submucosa, difuso, moderado (2/6).



**Figura 16.** Corte histológico de Pulmón, feto bovino (ID 3). Se observa bronconeumonía neutrofílica difusa, severa. H&E, 40x.



**Figura 17.** Corte histológico. Cavidad torácica, feto bovino (ID 7). Se observa pleuritis fibrinosa difusa severa (derecha) con bronconeumonía neutrofílica (izquierda). H&E, 10x.

Se realizó mPCR de las muestras congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  de líquido de abomaso (LA) y pulmón de 10 fetos abortados por *C. fetus* para evaluar comparativamente con pruebas convencionales (IFD y cultivo bacteriológico) (**Tabla 9**). En los 10 fetos elegidos se detectó *C. fetus* de pulmón y LA por cultivo e IFD. Mediante mPCR se obtuvo una eficiencia del 90% (9/10) de las muestras de LA, siendo muy superior a la detección de desde muestras de pulmón (40%, 4/10). En 4 muestras del LA hubo inconsistencia en identificación de subespecie entre la mPCR y la tipificación por cultivo. Dos muestras indicadas como Cfv por mPCR resultaron Cff por cultivo y pruebas bioquímicas; mientras otras 2 muestras indicadas como Cff por mPCR, fueron Cfv por cultivo y pruebas bioquímicas. En cuanto a la subespeciación desde las muestras de pulmón, 1 muestra que resultó Cff mediante mPCR, fue identificada como Cfv por cultivo y pruebas bioquímicas, mientras las restantes 3 fueron coincidentes entre ambas técnicas.

La utilización de LA para detección de *C. fetus* por PCR, a pesar de un largo tiempo de conservación y tras períodos de descongelado resultó una muestra muy adecuada, permitiendo acortar tiempos respecto al cultivo. Por su lado, la detección a partir de pulmón tuvo una muy baja eficiencia no siendo una muestra adecuada.

Las inconsistencias en la subespeciación entre técnicas muestran que no se logra una discriminación de subespecie adecuada, siendo necesario criterios mas

rigurosos para diferenciación entre subespecies de *C. fetus* ya sea por métodos moleculares como convencionales.

**Tabla 9.** Resultados de detección de *Campylobacter fetus* de pulmón y líquido de abomaso de 10 fetos bovinos abortados por *C. fetus* mediante mPCR, cultivo e IFD.

ID	Líquido de abomaso			Pulmón		
	Cultivo	IFD	mPCR	Cultivo	IFD	mPCR
16164	Cff	+	Cff	Cff	+	Cff
16298	<b>Cff</b>	+	<b>Cfv</b>	Cff	+	Cff
17211	Cff	+	Cff	Cff	+	Cff
17288	Cff	+	Cff	Cff	+	neg
19125	<b>Cff</b>	+	<b>Cfv</b>	Cff	+	neg
19169	Cff	+	neg	Cff	+	neg
19268	Cff	+	Cff	Cff	+	neg
19302	Cff	+	Cff	Cff	+	neg
19304	<b>Cfv</b>	+	<b>Cff</b>	Cfv	+	neg
19322	<b>Cfv</b>	+	<b>Cff</b>	<b>Cfv</b>	+	<b>Cff</b>

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

### 1.3 Discusión

Los estudios de infección experimental con *C. fetus* han llevado a resultados de baja eficiencia en la reproducción de la infección en el bovino (Cobo et al. 2004; Marcellino et al. 2015). En el presente trabajo, propusimos un modelo experimental bovino alternativo para *C. fetus*, con infección natural de los toros tras servicio natural con vaquillonas experimentalmente infectadas (García, Gioffré et al 2021), el cual mimetiza la infección natural de forma exitosa.

Este modelo resultó en la infección experimental de 21/24 vaquillonas experimentalmente infectadas, con su respectiva cepa (Cff, Cfv o Cfv). A partir de las mismas se infectaron de forma natural los 3 toros (cada uno con su respectivo grupo de vaquillonas según subespecie) luego de un servicio natural de solo 39 días. Esto permitió el seguimiento de la infección de las 3 subespecies relevantes para bovinos y evaluación de técnicas diagnósticas (convencionales y moleculares) para la detección de *C. fetus* en muestras de secreciones genitales tanto de macho como hembra.

#### 1.3.1 Evaluación de la infección por *Campylobacter fetus* en vaquillonas experimentalmente infectadas, mediante pruebas moleculares y convencionales

En las vaquillonas experimentalmente infectadas, se detectó al patógeno, con mayor frecuencia y en mayor número de animales cuando se empleó C<sub>fv</sub>, seguido de C<sub>ff</sub> y luego por C<sub>f</sub>. Esto puede estar asociado a una mayor capacidad de colonización y adhesión de este biovar o, a una menor inducción de una respuesta local protectora en los animales. Este biovar intermedius comparte características fenotípicas con C<sub>ff</sub> como la capacidad de producción de H<sub>2</sub>S, con la diferencia que C<sub>fv</sub> es un hospedador exclusivo del tracto genital de bovinos causante de CGB, característica común con C<sub>f</sub> (van der Graaf-van Bloois et al. 2014; Farace et al. 2019). Sin embargo, no está esclarecido la posibilidad de otros factores de virulencia o islas de patogenicidad de este biovar que estén asociados a mayor virulencia o colonización como se sugiere en el presente trabajo.

Particularmente, las vaquillonas del grupo tratado (GT) -C<sub>fv</sub> mostraron una baja en la positividad de las pruebas a partir de los 60 días pos inoculación, donde solo un animal se mantuvo positivo hasta el final del ensayo (285 días). Esto concuerda con lo descrito por otros autores, donde C<sub>f</sub> es mayoritariamente eliminada dentro de los 3 meses de infección habiendo una proporción muy baja de animales que continúan infectados luego de ese tiempo (Campero et al. 2017). A su vez, la ausencia de preñez de este GT-C<sub>fv</sub> está asociada a su capacidad de infertilidad y muerte embrionaria (Mshelia et al. 2007; Michi et al. 2015; Campero et al. 2017), que junto al servicio natural corto en el presente trabajo (39 días), probablemente impidió que las vaquillonas vuelvan a ciclar para preñarse en otra oportunidad.

La subespecie C<sub>ff</sub> en bovinos se asocia a abortos esporádicos sin afectar fertilidad (Sahin et al. 2017; Balzan et al. 2020), lo cual concuerda con nuestros resultados ya que observamos una preñez mayor (62,5%, 5/8) que la de los grupos infectados con cepas venéreas (0% y 25% para C<sub>f</sub> y C<sub>fv</sub>, respectivamente). Dos vaquillonas del GT-C<sub>ff</sub> abortaron, y aunque no se pudo recuperar el feto para confirmar la infección por C<sub>ff</sub> de los mismos, las muestras de MCV de las madres resultaron positivas a *C. fetus* lo cual podría sugerir fuertemente que el aborto se produjo por la subespecie en cuestión. Las demás vaquillonas preñadas tanto de los grupos experimentales como del grupo control lograron llevar a término la preñez.

Teniendo en cuenta el total de vaquillonas infectadas, un 33,3% (8/24) resultaron positivas a su respectiva cepa de *C. fetus* hasta al menos 9 meses. Estas vaquillonas vacías portadoras se comportan como fuente de infección si se le da otra oportunidad mediante servicio, manteniendo el patógeno en el rodeo y así el ciclo de reinfección. Este estado de vaquillona “carrier” o portadora entre servicios es conocida,

pero al momento se la considera poco probable (<5%) (Cipolla et al. 1994; Campero et al. 2017). El elevado porcentaje de animales portadores en este trabajo puede asociarse a una alta carga de bacteria inoculada durante la infección experimental lo que mejoraría la colonización y la posterior persistencia en el tracto reproductor genital de las vaquillonas. Sin embargo, se puso en evidencia la alta persistencia que puede tener *C. fetus* en el tracto reproductor de la hembra. Particularmente, hay escasa información de la capacidad de persistencia de Cff en vaquillonas. De las 8 vaquillonas experimentalmente infectadas con Cff, 2 resultaron infectadas hasta al menos 285 días. Esto ha sido reportado en un trabajo previo de nuestro grupo donde la bacteria se aisló hasta 167 días pos infección (Marcellino et al. 2015). Aunque su rol como enfermedad venérea no está esclarecido, es bien conocida su capacidad de aborto en bovinos (Sahin et al. 2017) pudiendo tener un rol importante en mantener y/o diseminar la infección. La gran mayoría de las vaquillonas portadoras (5/8) correspondían al GT-Cfvi, pudiendo actuar como un biovar más adaptado al tracto reproductor con mayor capacidad de colonización y persistencia, siendo que todas las vaquillonas experimentalmente infectadas de este grupo resultaron positivas tras el primer inóculo. Aunque no se documentan diferencias de patogenicidad entre Cfv y Cfvi, se han identificado rasgos genómicos diferenciales entre ambos (Silva et al. 2021). Silva et al. (2021) sugiere que puede haber diferencia en patogenicidad aunque las mismas no han sido dilucidadas y futuros estudios ayudarían a un mejor entendimiento de la patogénesis y virulencia de este biovar.

En este estudio, tanto las técnicas convencionales como moleculares resultaron en una moderada a baja tasa de detección en muestras de MCV. La alta persistencia en tiempo de las bacterias en las vaquillonas sugiere que la baja detección por las técnicas sea principalmente por las características de la muestra de aspecto viscoso que dificulta el aislamiento y detección, como así también probablemente limite la extracción de ADN (Cortés et al. 2014; Yarohkno et al. 2015). La baja positividad observada con el control endógeno (58%) mediante qPCR, evidencia que hubo una falla en los métodos de extracción de ADN no logrando una calidad adecuada. Sería óptimo implementar el mismo sistema de detección que para el gen blanco de *C. fetus*, para estar bajo iguales condiciones y hacer una comparación óptima entre la calidad de ADN logrado y la detección de *C. fetus*. Para esto, se podría desarrollar una multiplex qPCR donde incluya los primers dirigidos a la secuencia del control endógeno interno y al *C. fetus*. Este sistema de detección simultáneo sería una herramienta valiosa para corroborar calidad del ADN y comparar con el resultado de

detección de *C. fetus*, en este caso. Esto se realizaría en una reacción, siendo más rentable y ahorrando tiempo. Otro factor a tener en cuenta es la dinámica de *C. fetus* en el tracto reproductor de las hembras ya que generalmente se comporta como una infección autolimitante en las vacas (Cipolla et al. 1994; Campero et al. 2017). Esto puede llevar a subestimar la tasas de detección al incluir vaquillonas como positivas que en gran mayoría se han “limpiado” de la infección, siendo negativas. La dificultad en la manipulación de muestras de MCV por su consistencia también se presenta en el cultivo bacteriológico. Sin embargo, resultó en una mayor tasa de detección como previamente se ha reportado (Yarohkno et al. 2015), sugiriendo que sea la técnica diagnóstica de elección para este tipo de muestra al momento. La misma podría acompañarse de qPCR como técnica complementaria, teniendo en cuenta la baja concordancia entre ambas pruebas diagnósticas, para lograr un diagnóstico eficiente.

La información es escasa respecto a la comparación de técnicas implementadas en estas muestras. Un trabajo previo reportó mejores resultados con PCR (Groff et al. 2010) respecto del cultivo, aunque en el mismo utilizan el protocolo de Hum y col. (1997) el cual ha mostrado baja tasa de detección de Cfv y/o reacción cruzada con otras especies (Spence et al. 2011; Silva et al. 2020; Polo et al. 2021). Otros trabajos utilizan la PCR como método de diagnóstico para determinar prevalencia de infección de Cfv en la región, pero no evalúan contra técnicas convencionales *gold estándar* como el cultivo bacteriológico (Szymanska-Czerwinska y Niemczuk 2011; de Oliveira et al. 2015; Oliveira Filho et al. 2018). Del mismo modo, estos trabajos utilizaron el protocolo de Hum y col. (1997).

Respecto de los dos métodos de extracción de ADN para qPCR, el kit comercial resultó ampliamente mejor que el método In-House basado en lisis por calor. La muy baja tasa de detección de *C. fetus* (8%) mediante este último método muestra que este protocolo no debe ser considerado para futuros ensayos con muestras de MCV.

Adicionalmente, en un bajo número de muestras de MCV, se probó un método de lisis “overnight” en baño húmedo previo a la extracción de ADN con kit comercial logrando licuar la consistencia viscosa de la muestra para una mejor manipulación. Se observó una mejor tasa de detección de *C. fetus* con mPCR (67%) respecto a la utilización directa de kit comercial y posterior qPCR (48%). Esto muestra un potencial para el procesamiento de muestras de consistencia viscosa como el MCV por pruebas moleculares, para el diagnóstico de distintos patógenos como *C. fetus*.

*Campylobacter* spp., principalmente Cff, está asociado a bacteriemia e infección extraintestinal en humanos (Monno et al 2004) y rumiantes (Sahin et al 2017). En nuestro trabajo no pudimos detectar la presencia de *C. fetus* en ninguna de las muestras de sangre de las vaquillonas con qPCR o cultivo bacteriológico. Posiblemente tenga que ocurrir un episodio de inmunosupresión por parte de la vaquillona como lo observado en humanos para que haya bacteremia (Wagenaar et al. 2014). Otra posibilidad es que esta vía de patogénesis con diseminación sanguínea no se presente en bovinos como lo sugerido en ovinos u otras especies (Fenwick et al 2000; Bidewell et al 2016; Campero et al 2017). A su vez, en el presente trabajo se realizó la inoculación de la bacteria directamente en el tracto reproductor, no siguiendo la patogenia natural sugerida y descrita en ovinos donde la bacteriemia y aborto se presentan tras colonización del intestino por parte del Cff (Sahin et al. 2017). Sería importante evaluar esta patogénesis de Cff en bovinos tras inoculación oral con el fin de evaluar traslocación a través de la mucosa intestinal, diseminación sistémica y llegada al útero grávido. En las cepas venéreas, Cfv y su biovar *intermedius*, es bien conocida la vía ascendente de afección del tracto reproductor por vagina sin estar documentada la bacteriemia (Bon Durant 2005; Campero et al. 2017; Sahin et al. 2017). Nuestro trabajo estuvo en línea con estos autores.

### **1.3.2 Evaluación de detección de *Campylobacter fetus* en toros naturalmente desafiados, mediante pruebas moleculares y convencionales**

El toro es el principal blanco para el diagnóstico de rutina y control de la campilobacteriosis genital bovina (CGB). Sin embargo, existen dificultades en su diagnóstico, aún por superar para luego poder establecer medidas de prevención y control efectivas (Silveira et al. 2018).

En este estudio, a pesar del bajo número de toros utilizados, todos los toros resultaron infectados luego de un período de servicio natural de sólo 39 días con vaquillonas experimentalmente infectadas con Cff, Cfv y Cfvi, respectivamente. Esta eficiencia puede explicarse por la edad de los toros (4 a 5 años) donde la profundidad de los pliegues y criptas prepuciales se incrementa con la misma (>3 años), creando un nicho donde *C. fetus* encuentra condiciones favorables y seguras para persistir, y por la alta concentración de bacterias logradas en las vaquillonas por la inoculación experimental (Bon Durant 2005; Campero et al., 2017; Pena-Fernández et al 2021). Esto se reflejó en una rápida y fácil transmisión con las tres subespecies de *C. fetus*.

En los toros infectados con cepas venéreas (Cfv y Cfvi) se observó persistencia durante todo el ensayo (más de 9 meses) confirmando su estado portador entre servicios (García et al. 2021b), tal cual lo reportado en trabajos previos (Bon Durant 2005, Michi et al. 2015; Campero et al. 2017). Mientras que en el Toro-Cff la infección se sostuvo por al menos 5 meses pudiendo permitir la transmisión mecánica pasiva o activa en un servicio natural tradicional de tres meses o en sistemas con servicio continuo, manteniendo la enfermedad en el rodeo.

Aunque la infección por Cff no está catalogada como enfermedad de transmisión sexual, se evidenció la transmisión al toro desde las vaquillonas con persistencia por meses, siendo un riesgo teniendo en cuenta también la alta persistencia evidenciada en las vaquillonas de nuestro trabajo y en otros trabajos, y su asociación a bajas tasas reproductivas (Marcellino et al. 2015; Campero et al. 2017; Sahin et al. 2017; Balzan 2020). La persistencia de Cff en el toro coincide con Marcellino et al. (2015) donde se detectó a la bacteria en muestras de esmegma prepucial (EP) de toros experimentalmente infectados hasta 167 días pos-infección. La menor persistencia de Cff, respecto a los Toros-Cfv y -Cfvi, pudo deberse a su menor adaptación al tracto genital explicado por la ausencia de proteínas de superficie, islas de patogenicidad y elementos móviles que predominan en Cfv y le permiten un mayor tiempo de supervivencia en tracto urogenital (Gorkiewicz et al 2010; Sprenger et al 2012; Sprenger et al. 2017; Nadin-Davis et al 2021).

Aunque solo se estudió una cepa de Cff, sugerimos que esta subespecie sea considerada en el diagnóstico de CGB en toros, como potencial diseminador de la bacteria a vacas o vaquillonas durante el servicio natural. Esto se ve reforzado por trabajos que identificaron la subespecie Cff de muestras prepuciales de toros infectados naturalmente asociados a bajas tasas reproductivas (Devenish et al 2005; Botelho et al 2014).

La eficiencia de las tres técnicas evaluadas (IFD, cultivo y qPCR) a partir de EP de los tres toros resultó buena sin presentar diferencias significativas entre ellas. Sin embargo, hubo una mayor tasa de detección de *C. fetus* mediante la técnica molecular (75%) comparado con las convencionales (66-63%). La concordancia observada entre las tres técnicas fue de moderada a buena, pudiendo utilizarse como complementarias en rodeos endémicos, con el fin de reducir resultados falso-negativos. La tasa de detección observada sugiere realizar 2 raspajes negativos consecutivos para considerar a un toro negativo con cualquiera de las técnicas diagnósticas empleadas.



El cultivo bacteriológico mostró una mejor eficiencia para los animales infectados con las cepas venéreas (Cfv y Cfvi) ( $P=0,011$ ), con una mayor recuperación para Cfvi ( $P>0,05$ ), obteniéndose mejores resultados que en otros reportes (63-67% vs. 33-38%) (McMillen et al 2006; García Guerra et al 2014). Mientras que con IFD hubo diferencias significativas ( $P=0,006$ ), detectándose mejor de las muestras provenientes de animales infectados con Cfvi comparado con Cff y Cfv. La mayor detección en los grupos infectados con las cepas consideradas venéreas podría explicarse por una mayor concentración de la bacteria en prepucio por su conocido tropismo exclusivo por el tracto genital. Estudios previos reportan una detección de Cfv con IFD en un rango del 69,4% al 92,6% (Figueiredo et al., 2002; Campero et al., 2017), coincidente con el presente trabajo (72%). Estos estudios no contemplan a Cff en el diagnóstico. Cuando en nuestro trabajo se incluye también la subespecie Cff la detección es menor (63%), asociada a la menor persistencia de esta subespecie en el tracto genital del toro. Aunque la eficiencia de la IFD resultó moderada, es una técnica aún muy utilizada en nuestro país y en países de la región por su bajo costo, practicidad y su rápido procesamiento (Campero et al. 2017; Silveira et al. 2018; Balzan et al. 2020).

En nuestro trabajo, no obtuvimos diferencias significativas entre el cultivo y la IFD, a diferencia de otros estudios que muestran mejores resultados por cultivo bacteriológico, asociado a una baja carga bacteriana y/o a la baja calidad de la muestra recolectada (Clark et al. 1978; Marcellino et al. 2015). La moderada concordancia entre el cultivo bacteriológico y la IFD abre el debate del uso de ambas técnicas diagnósticas en establecimientos ganaderos con CGB endémica, para reducir los toros falso-negativos.

La detección de *C. fetus* en EP por qPCR con dos métodos de extracción de ADN resultó igual o más eficiente (66,6%-75%, extracción de ADN con kit comercial y método In-house LBT, respectivamente) que mediante la aplicación de las técnicas convencionales (66,6% y 56%; cultivo e IFD, respectivamente). Esto está de acuerdo con estudios previos (McMillen et al. 2006; Groff et al. 2010; Schmidt et al. 2010; García Guerra et al. 2014; Erickson et al. 2017; Del Piazzo et al. 2021; Polo et al. 2021; Mederos et al. 2022).

Se destaca que el método de extracción de ADN IH-LBT resultó ligeramente mejor que el kit comercial en estas muestras, siendo una importante alternativa debido a los menores costos y tiempo de procesamiento que implica. Como métodos de extracción de ADN, los kits comerciales resultaron en extracciones más “limpias” pero

de mayor procesado y menor rendimiento, comparado con el método de lisis por calor que resultó más eficaz, en un menor tiempo procesado y con un costo mínimo. Si bien puede esperarse mayor contaminación que inhiba la PCR, no tuvimos evidencias de una inhibición masiva en este tipo de muestras (McMillen et al. 2006; Chaban et al. 2012; Mederos et al. 2022). Es importante mencionar el impacto del empleo de buenas prácticas durante la toma de las muestras de EP de los toros en el diagnóstico. Es necesario realizar tricotomía y limpieza del orificio prepucial previo a la introducción del instrumento de muestreo en la cavidad prepucial para la toma de muestra con el fin de evitar la contaminación de la muestra clínica con barro o materia fecal. A su vez, es importante evitar la micción del toro durante el muestreo el cual diluye la muestra recolectada.

Las técnicas moleculares pueden presentar distintas limitaciones que pueden impactar en una menor sensibilidad o especificidad en la detección. Entre estas se pueden mencionar las reacciones cruzadas con bacterias relacionadas, la presencia de contaminantes como sangre, orina o pus, que son potenciales inhibidores que pueden afectar la efectividad de la qPCR, principalmente en muestras clínicas (Willoughby et al. 2005; McMillen et al. 2006; Schulze et al. 2006; Abril et al. 2010; Spence et al. 2011; Sanhueza et al. 2014; Silveira et al. 2018, Polo et al. 2021; Mederos et al. 2022). Sin embargo, resultan apropiadas para el manejo de un gran número de muestras. En el presente estudio, se seleccionó un protocolo de qPCR, que incluyó una sonda TaqMan para una mayor sensibilidad y especificidad y que fue previamente caracterizada (Iraola et al. 2016).

Por otro lado, la extracción de ADN es un factor crucial para el empleo de las técnicas moleculares en muestras clínicas. En este trabajo, el protocolo IH-LBT resultó en una mejor tasa de detección de *C. fetus*. El bajo costo y el menor tiempo de procesamiento respecto del empleo de un kit, hacen que mejore la probabilidad que las técnicas moleculares sean incorporadas en los laboratorios de nuestro país, donde el costo de los kits comerciales es alto.

Finalmente, las condiciones especiales de cultivo de la bacteria y la baja sensibilidad de la IFD hacen que la qPCR sea una técnica diagnóstica muy adecuada y prometedora para la detección de *C. fetus*.

Es necesario un mayor conocimiento para conocer la implicancia en el rendimiento reproductivo de cada subespecie y variante de *C. fetus* en los bovinos, aunque, dadas estas dificultades en la subtipificación y su asociación con el aborto, sugerimos que Cff sea incluido junto a Cfv y Cfvi en el diagnóstico de la CGB.

Las diferencias en la detección de *C. fetus* entre las distintas técnicas diagnósticas pueden estar asociadas al estado del animal (inmunidad local), y a las diferencias entre las distintas cepas (factores de virulencia y concentración bacteriana) (Van Bergen et al., 2005; Mshelia et al., 2007). Dado estos factores y en conjunto con la eficiencia del muestreo y de las técnicas diagnósticas, dos muestreos consecutivos negativos serían necesarios para un diagnóstico confiable (García Guerra et al 2014; Mederos et al. 2022; Del Piazzo et al 2021).

Al igual que en las vaquillonas, la evaluación de la presencia de *C. fetus* en las muestras de sangre resultó negativa en todos los períodos analizados para los tres toros. Esto concuerda con la baja a nula respuesta inmunológica a nivel sistémico en el toro tras colonización prepuccial, limitándose a una infección local (Campero et al. 2005; Campero et al. 2017).

### **1.3.3 Estudio de establecimientos bovinos con infección endémica de *Campylobacter fetus* mediante pruebas moleculares y convencionales: Análisis de fetos y mucus cérvico vaginal**

Todos los establecimientos ganaderos visitados presentaron antecedentes de baja preñez y/o abortos, en los que se detectó *C. fetus* a partir de los fetos bovinos abortados y/o del mucus cérvico-vaginal (MCV) de las vacas. La detección de *C. fetus* por cultivo, IFD y/o qPCR a partir de muestras de MCV de las vacas abortadas solo resultó en 8/53 muestras positivas, correspondiendo a 4 de los 7 establecimientos estudiados. Al igual que lo observado en las vaquillonas experimentalmente infectadas, el cultivo bacteriológico resultó la técnica más eficiente en detectar *C. fetus* de MCV (n=7) respecto a la IFD (n=3) y qPCR (n=4).

Esta baja tasa de detección se debe principalmente al prolongado tiempo entre el aborto y el muestreo de las vacas abortadas (3 a 6 meses) permitiendo la eliminación de la bacteria del tracto reproductor durante ese período. Otros factores implican la variación de la concentración bacteriana ubicándose en vagina o útero dependiendo del ciclo estral y/o estadio de gestación (Cipolla et al. 1994; Bon Durant 2005; Michi et al. 2015; Campero et al. 2017) y la baja sensibilidad reportada de las técnicas tanto convencionales como moleculares en MCV (Marcellino et al. 2015; Yarohkno 2015; Campero et al. 2017; Silveira et al. 2018).

El MCV resulta habitualmente una muestra menos contaminada que las secreciones genitales de toros, aunque sus propiedades biofísicas dificultan su

procesamiento. Por otro lado, las características de la muestra varía según el período reproductivo, presentando una alta viscosidad lo que dificulta su manipulación (Cortes et al. 2014). La baja sensibilidad de las técnicas para detectar *C. fetus* a partir de MCV y el factor de eliminación relativamente rápido de la bacteria del tracto reproductor de la hembra enfatiza en la importancia del muestreo de varias hembras abortadas y en un lapso de menos de 1 mes de presentado el aborto en establecimientos ganaderos con problemas reproductivos donde se sospecha de infección por *C. fetus*. Eso se evidenció en el presente trabajo donde solo se logró detectar el patógeno en el 15% de las muestras de MCV.

La eficiencia de la PCR multiplex (mPCR) a partir de MCV de muestras de campo resultó muy baja (2/8). Esto como previamente mencionado por las características de la muestra como así también por la menor sensibilidad de la PCR convencional. Del mismo modo, también hubo inconsistencia entre las pruebas fenotípicas y genotípicas en una de las muestras de MCV donde se detectó Cfv mediante mPCR y Cff por pruebas fenotípicas. En este caso la cepa no es conocida pudiendo ser una falla en la caracterización fenotípica o una reacción cruzada por presencia del gen *virB11* en la cepa de Cff involucrada en el caso (Schulze et al. 2006; Abril et al. 2010; Gorkiewicz et al. 2010; Spence et al. 2011; van der Graaf-van Bloois et al 2013).

En todos los fetos bovinos recuperados, se detectó *C. fetus* por cultivo e IFD tanto de pulmón como de líquido de abomaso (LA) en acuerdo con lo obtenido por Morrell y col. (2011). Aunque el número de fetos analizados fue bajo (n=6) todos fueron fenotípicamente caracterizados como Cff.

En uno de los establecimientos (ID 5) en una muestra de MCV se identificó Cfv por mPCR mientras por las pruebas bioquímicas se identificó Cff, coincidiendo esta última con la cepa aislada del feto abortado de ese establecimiento. De forma similar, en otro establecimiento (ID 6) hubo diferencia fenotípica del aislamiento de *C. fetus* del MCV de una vaquillona (Cfvi) respecto al feto (Cff). Esto pudo deberse a una falla en las pruebas fenotípicas, ya que Cff y Cfvi comparten características como la producción de H<sub>2</sub>S (van der Graaf-van Bloois et al. 2014; Farace et al. 2019), aunque no se puede descartar la participación de más de una cepa en la infección (co-infección). La tipificación fenotípica se realiza a partir de un aislamiento único por lo que muy probablemente si existe co-infección sólo detectamos una de las subespecies involucradas. Sin dudas, los estudios de secuenciación de genomas y análisis genómico comparativos podrán arrojar luz sobre estos aislamientos.

Los hallazgos macroscópicos de pericarditis y pleuritis fibrinosa hallados en dos de los fetos son característicos en la infección por *C. fetus* (Kirkbride 1993; Anderson 2007; Cabell 2007), pero puede presentarse con otras infecciones bacterianas como *Chlamydia pecorum*, *Bacillus* spp. and *Brucella abortus* (Xavier et al 2009; Njaa 2012; Struthers et al 2021). Sin embargo, es un hallazgo poco frecuente, siendo que la mayoría de los fetos no evidencian cambios macroscópicos y en acuerdo con otros autores (Campero et al. 2005, Anderson 2007, Mahajan et al. 2014; Schlafer y Foster 2016). De igual forma, la lesión microscópica más relevante de bronconeumonía supurativa (neutrofílica) es altamente compatible con aborto bovino asociado a *C. fetus* (Campero et al. 2003, Campero et al. 2005, Morrell et al. 2011, Mahajan et al. 2014), aunque la misma puede presentarse también con otras infecciones bacterianas como *Brucella abortus*, *Bacillus licheniformis*, *Trueperella pyogenes*, o *Escherichia coli*, o incluso por infección protozoaria por *Tritrichomona foetus* (Anderson 2007, Clothier y Anderson 2016, Morrell et al. 2019). Las otras lesiones encontradas como meningitis, serositis, enteritis y hepatitis son frecuentes en abortos bovinos por *C. fetus* (Campero et al. 2003, Campero et al. 2005, Anderson 2007, Morrell et al. 2011) pero de carácter inespecífico, pudiendo presentarse con otros patógenos. En todos los fetos bovinos abortados al menos 2 órganos (pulmón, hígado, SNC, corazón) presentaron lesiones inflamatorias. Estos hallazgos permiten confirmar una etiología infecciosa, aunque es necesaria la detección e identificación de *C. fetus* de LA y/o pulmón para un diagnóstico definitivo de aborto por *C. fetus* cultivo, IFD o PCR.

La utilización de las técnicas de diagnóstico en muestras clínicas de campo puede resultar frustrante teniendo en cuenta los factores de interacción hospedador-patógeno sumado al tipo de muestra que pueden ser muy complejas como el caso del MCV. Tal cual lo reportado previamente por Mederos y col. (2022), el traspaso de técnicas desde un ambiente experimental a casos naturales de campo resultó en una menor detección de *C. fetus* con las pruebas diagnósticas utilizadas. Sin embargo, el análisis de un número significativo de muestras, de distinta naturaleza y bajo distintos protocolos puede arrojar luz sobre el correcto procesamiento de las muestras.

De acuerdo a nuestros resultados se sugiere la utilización de MCV como muestras complementarias a muestras de EP de toros o fetos bovinos abortados, en rodeos con infección endémica con *C. fetus* o con problemas reproductivos de etiología desconocida, donde la campilobacteriosis puede ser un problema. Esta combinación de pruebas diagnósticas es esencial para asegurar resultados confiables.

La alta presencia de Cff en los fetos bovinos abortados y MCV, asociado a la menor eficiencia reproductiva en los establecimientos bovinos estudiados refuerza la sugerencia de incluir a Cff dentro de la campilobacteriosis genital bovina hasta avanzar en estudios que permitan diferenciar las mismas, y que confirmen la relevancia clínico-epidemiológica de Cff en bovinos.

#### **1.3.4 Aplicación de PCR multiplex para detección de *Campylobacter fetus* y diferenciación de subespecie en muestras clínicas y cepas aisladas de secreciones genitales de vaquillonas y toros y tejidos fetales de abortos por *C. fetus*.**

La diferenciación de subespecie mediante pruebas bioquímicas resulta laboriosa, consume tiempo y hay inconsistencias con el perfil fenotípico por lo que la posibilidad de desarrollar técnicas basadas en amplificación génica resulta de una gran ventaja y ahorro de tiempo (McMillen et al. 2006; van der Graaf-van Bloois et al. 2013; McGoldrick et al. 2013; Polo et al. 2021). Sin embargo, la sub especiación por métodos moleculares continua confusa, dado por el uso de secuencias o islas genómicas para discriminación entre subespecies de *C. fetus* por PCR, pero presente en ambas, Cff y Cfv, o incluso en otras especies de bacterias, llevando a resultados poco confiables (Moolhuijzen et al 2009; Abril et al 2010; Spence et al 2011; Silva et al 2020; Polo et al 2021).

Con este objetivo y conociendo la cepa actuante según vaquillona o toro infectado bajo condiciones experimentales (Cff, Cfv o Cfvi) se evaluó el protocolo de una mPCR optimizada a partir de la mPCR de Hum y col. (1997) (Iraola et al. 2012) para diferenciación de subespecies a partir de colonia y muestras clínicas de MCV y EP. El protocolo utiliza el gen *virB11*, reportado como específico para Cfv

La detección de *C. fetus*, independiente de su subespecie, resultó baja para las muestras clínicas, siendo 58% y 59% para EP y MCV, respectivamente. Esto evidencia que el protocolo utilizado no resulta confiable existiendo un escape de muchos animales falsos negativos. Como previamente mencionado deben estudiarse en muestras de MCV mejores métodos para la extracción de ADN que permitan tener un ADN de calidad y cantidad adecuada que permitan aumentar la eficiencia de detección.

En cuanto a la clasificación de subespecie por mPCR a partir de colonias tanto de los toros (n=9) como de las vaquillonas (n=9), coincidió en todos los casos con la

identidad de la cepa. De acuerdo a lo esperado, las cepas de Cfv no pudieron ser diferenciadas de las de Cff por la mPCR.

Tanto en las muestras clínicas de EP de los toros (n=12) como con las colonias aisladas hubo coincidencia en el total de muestras procesadas entre la mPCR y cepa actuante. En tanto en 2/10 muestras de MCV no hubo concordancia entre la mPCR y la identificación de las cepas por pruebas bioquímicas. Particularmente, las 2 muestras conocidas de Cff fueron detectadas por mPCR como Cfv. Al tratarse de cepas conocidas y repeticiones de las mismas esta incongruencia pudo deberse posiblemente a error intralaboratorio como posible contaminación durante alguna etapa del procesado, ya sea extracción de ADN o colocación del templado en la mix correspondiente. Otra posibilidad es que aunque *virb11* es considerada específica de Cfv no se puede descartar la posibilidad de su presencia en flora acompañante del animal (Abril et al. 2010; Gorkiewicz et al. 2010; Spence et al. 2011).

Con el mismo fin de evaluar la mPCR se analizaron y compararon con el cultivo bacteriológico y pruebas bioquímicas correspondientes, 10 fetos bovinos abortados por *C. fetus* registrados por el SDVE INTA Balcarce.

En los 10 fetos se detectó *C. fetus* por IFD y cultivo tanto de pulmón como líquido de abomaso (LA), de los cuales 8 se caracterizaron fenotípicamente como Cff y los restantes 2 como Cfv. La detección por mPCR a partir de LA resultó levemente menor (9/10), pero muy superior a la eficiencia de la prueba en muestras de pulmón (4/10), como se describió previamente (Morrell et al. 2011). El tiempo de conservación, y el congelado y descongelado de las muestras como la presencia de inhibidores tales como los componentes del tejido como lisozima, hemoglobina, urea y heparina pudieron haber afectado el rendimiento y la calidad del ADN bacteriano. Estos resultados permiten sugerir a la muestra de LA como muestra a elegir para el diagnóstico de *C. fetus* a partir de fetos bovinos abortados, ya sea por pruebas convencionales o moleculares. Tal como se describió con muestras clínicas de MCV y previamente reportado (van der Graaf-van Bloois et al. 2016), en 4 muestras de LA hubo inconsistencia de subespecie por mPCR comparado a las pruebas bioquímicas. Dos muestras de LA identificadas como Cff por mPCR fueron detectadas como Cfv por cultivo. Por otro lado, dos muestras resultaron Cfv y Cff por qPCR y cultivo, respectivamente. Sin embargo, en estas muestras no es conocida la cepa actuante tratándose de muestras clínicas de casos de campo, pudiendo existir inconsistencias con las pruebas fenotípicas o coinfección como se mencionó anteriormente (Wagenaar et al. 2001; Schulze et al. 2006; van der Graaf-van Bloois et al. 2014; Calleros et al.

2016). La confiabilidad de las pruebas bioquímicas puede verse influenciada por la transferencia horizontal de material genético como la transducción de tolerancia a la glicina por fagos, siendo esta una de las principales pruebas para diferenciar subespecies (van Bergen et al. 2005; van der Graaf-van Bloois et al 2013; Silva et al. 2020). Otra inconsistencia se puede presentar con Cfv biovar intermedius el cual da reacción positiva al test de H<sub>2</sub>S (Verón y Chatelain 1973) al igual que Cff, sin embargo este biovar será identificado por la PCR como Cfv, constituyendo una limitación importante. Las inconsistencias con las pruebas moleculares se asocian principalmente a la alta similitud genética entre las subespecies y transferencia horizontal de genes considerados específicos para Cfv a Cff (Moolhuijzen et al. 2009; Abril et al. 2010; Pena-Fernandez et al. 2021). El gen *virB11* se localiza en una isla genómica considerada específica para Cfv, aunque estudios revelaron su presencia en cepas de Cff u otras especies pudiendo existir reacción cruzada (Abril et al. 2010; Gorkiewicz et al. 2010; Spence et al. 2011; van der Graaf-van Bloois et al. 2016). Otra limitación es falla en la detección del biovar intermedius como Cfv como ocurre con el gen blanco de van Bergen y col. (2005c) (van der Graaf-van Bloois et al. 2013). A su vez este biovar puede presentar el mismo perfil que Cff (Moolhuijzen et al. 2009; Iraola et al. 2012), donde se detectó sólo uno de los blancos moleculares (Silva et al. 2021). Actualmente no existe un par de primers que distingan a Cfv de otras cepas de *C. fetus*, pudiendo representar un subgrupo heterogéneo dentro de *C. fetus* con genes que potencialmente se compartan entre subespecies y el biovar (Iraola et al. 2012).

Las inconsistencias evidenciadas con el gen *virB11* están asociadas a fallas en la especificidad, por lo que este blanco molecular resulta de escaso valor para identificación de subespecie.

La inconsistencia de los fenotipos y las características genómicas de las cepas de *C. fetus* fomenta una evaluación crítica de la relevancia clínico-epidemiológica de la identificación de subespecies de *C. fetus*. Sin embargo, a pesar de estas inconsistencias, la subespecie Cff predomina tanto en secreciones genitales de hembras abortadas como correspondientes fetos evidenciando un alta importancia en la salud reproductiva de los bovinos.

#### **1.4 Conclusión**

El modelo experimental presentado, mimetiza la infección natural y constituye una alternativa prometedora para futuros estudios de campilobacteriosis bovina, con



las 2 subespecies de *C. fetus* (incluyendo el biovar *intermedius*) de relevancia en bovinos.

El ensayo de qPCR, teniendo en cuenta los métodos de extracción, para detección de *C. fetus* en MCV resultaron de baja eficiencia, siendo el cultivo bacteriológico la técnica adecuada al momento. Es necesario continuar estudiando alternativas que permitan disolver la consistencia viscosa del MCV para una mejor manipulación de las muestras y mejorar la calidad/cantidad de ADN tras su extracción. Ante esto, el protocolo casero de lisis en baño húmedo tiene potencial, siendo necesario aplicarlo a un mayor número de muestras. La alta persistencia de subespecies poco registradas como Cff y Cfv en el tracto reproductor de las vaquillonas en el presente trabajo, pone de manifiesto la necesidad de futuros estudios abocados a su patogénesis y relevancia epidemiológica.

La detección de infección de *C. fetus* en los toros resultó similar con cualquiera de las pruebas diagnósticas evaluadas. El protocolo de qPCR resultó prometedor para el diagnóstico de CGB de muestras clínicas, siendo una alternativa rápida y eficiente respecto al cultivo, aunque su mayor costo y equipos necesarios pueden ser una limitante. Aunque la subespecie Cff no es considerada venérea, la capacidad de colonización y persistencia temporal observada en el prepucio sugiere que puede ser un riesgo en rodeos con servicio natural.

Este trabajo evidencia la colonización y persistencia de Cff en el tracto reproductor vaquillonas y toros junto a una alta presencia en abortos bovinos sugiriendo que se incluya como parte de la CGB.

El traspaso del diagnóstico de un ambiente experimental controlado a casos de campo resulta en menor eficiencia, siendo necesario validar la técnica con más muestras de campo, tanto de MCV, EP y tejido fetales. En establecimientos con problemas asociados a *C. fetus* es esencial la combinación de pruebas diagnósticas y de las distintas muestras disponibles para arribar a un diagnóstico correcto.

Las incongruencias en la discriminación de subespecies mediante mPCR entre Cff y Cfv hacen necesario pensar en la detección solo de *C. fetus*. Particularmente el gen *virb11* no resulta adecuado para tal fin.

## CAPÍTULO 2

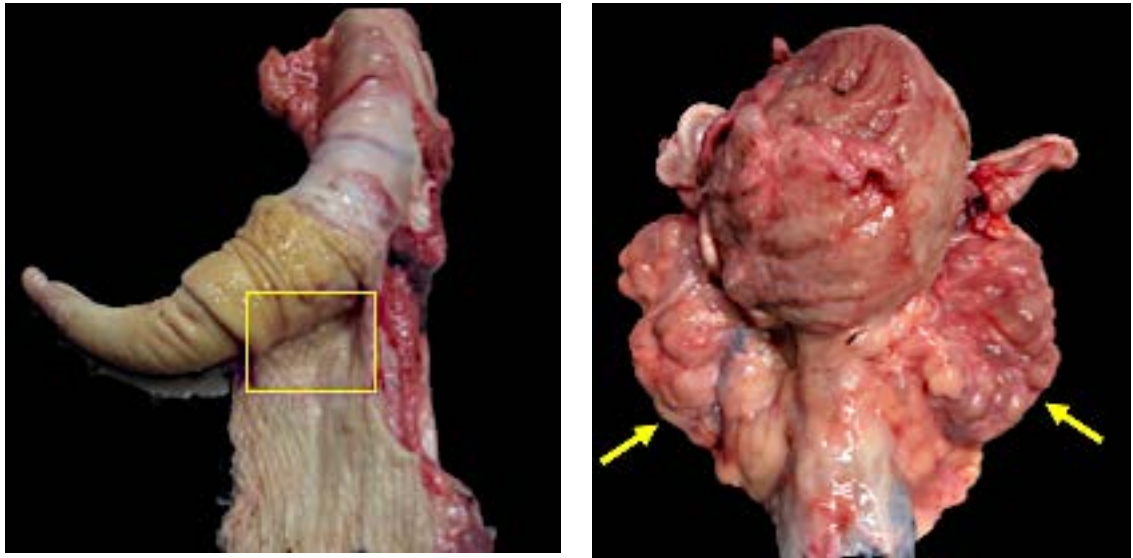
### DETECCIÓN DE *CAMPYLOBACTER FETUS* DESDE SEMEN, VESÍCULAS SEMINALES Y MUCOSA PREPUCIAL DE TOROS NATURALMENTE INFECTADOS CON *C. FETUS*.

#### 2.1 MATERIALES Y MÉTODOS

En el modelo experimental bovino se recolectaron muestras de semen de los tres toros de los GT (-Cff, -Cfv y -Cfvi) al día 0 (control negativo), 52, 95, 145 y 283 por electroeyaculación para cultivo bacteriológico e inmunofluorescencia directa (IFD) (previa colocación en solución formolada al 1%). Una vez recolectadas eran transportadas al laboratorio dentro de las 2 h. La técnica de electroeyaculoación constaba de un electroeyaculador en el recto del toro para estimular la próstata y vesículas seminales con pulsos eléctricos leves, primero hasta que el animal presentaba erección y luego la eyaculación propiamente dicha (hasta 12 voltios) (Román et al. 2014). En cada toro, se recolectaba la segunda fracción del eyaculado (rica en espermatozoides), evitando las primeras eyaculaciones correspondientes a la fracción pre espermática. La primera fracción (pre espermática) del eyaculado es incolora mientras la fracción secundaria de color cremoso u opalescente. Esta recolección se hacía con aro de plástico con mango que sostiene un embudo de latex colector que conducía el semen a un tubo falcon de 50ml. Entre el muestreo de cada toro se cambiaba el equipamiento utilizado con el fin de evitar contaminación cruzada.

Una vez finalizado el modelo experimental se realizó el seguimiento a faena (día 290) de los Toros-Cfv y -Cfvi donde se recolectó *pos-mortem*, mucosa prepucial del área de fornix, glándulas bulbouretrales, ampollas y vesículas seminales, removidas con bisturí y almacenadas en colectores estériles individuales para ser transportadas al laboratorio de bacteriología dentro de las 2 h. En una cabina de seguridad con flujo laminar, se removió el tejido circundante de las vesículas seminales, ampollas y glándulas bulbouretrales, y se tomaron asépticamente las porciones internas; mientras para la mucosa prepucial se realizó un raspado con la hoja de bisturí y se recolectó el material (**Fig. 18**). Cada muestra se procesó para cultivo bacteriológico. Los materiales de disección y guantes se cambiaron entre animal y muestra para evitar contaminación cruzada. Las colonias aisladas e identificadas como *C. fetus* fueron procesadas por IFD y se confirmó la especie mediante PCR tiempo final.

Muestras de tejido de las vesículas seminales, ampolla, glándulas bulbouretrales y mucosa prepucial fueron fijadas en formol tamponado al 10%, pH 7.2 por 48 h. Luego, secciones de 4  $\mu\text{m}$  fueron preparadas y teñidas con H&E siguiendo los protocolos estándar para estudio histológico.



**Figura 18.** Toro-CFV, tracto reproductor. A) Área del fómix (cuadrado amarillo) donde se recolectó la muestra de mucosa prepucial; y B) órganos sexuales accesorios, de los cuales se extrajeron las vesículas seminales (flecha amarilla).

### **Análisis de PCR tiempo final para detección de *C. fetus* de colonias**

El análisis de PCR tiempo final se realizó de colonias aisladas e identificadas como *C. fetus* por cultivo bacteriológico de muestras de semen, mucosa prepucial y vesículas seminales. Las colonias fueron suspendidas en Tris-EDTA buffer y hervidas a 100°C. La suspensión fue centrifugada a 12,000 xg y alícuotas de 2.5  $\mu\text{l}$  del sobrenadante fueron usados como templado. Una región específica de *C. fetus* (orf 1591 de *C. fetus* 82-40) (número de acceso CP000487) fue amplificada (Gal et al. 2015; García, Gioffré et al. 2021). El mix de amplificación consiste en 1  $\times$  GoTaq green buffer de reacción (1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ ), 0.25 mM de cada dNTP, 0.1  $\mu\text{M}$  de cada primer (1591for-atgctctgggcgctaactgt and 1591R-ggctctccacctccgctaaa), 1.25 U Taq polymerase (Promega Corp., Madison, WI, USA), 2  $\mu\text{l}$  de ADN templado de *Campylobacter* y agua ultrapura libre de nucleasas para llegar al volumen final de 25  $\mu\text{l}$ . El protocolo de amplificación del termociclador consistió en un paso inicial de 94 °C por 3 min, 10 ciclos at 94 °C for 30 seg, seguido de temperatura de annealing empezando a 60 °C por 1 min y disminuyendo 1 °C por ciclo hasta 50 °C. Luego, un paso de extensión se realizó a 72 °C por 1 min, seguido de 30 ciclos con un annealing

a 55 °C. El paso de finalización fue de 72 °C por 8 min. La presencia de un producto de amplificación de 438pb confirmó la presencia de *C. fetus*.

## 2.2 RESULTADOS

El *C. fetus* está asociado a prepucio y uretra de toros, sin embargo, la bacteria puede contaminar el semen y sobrevivir la criopreservación, siendo la inseminación artificial no controlada un riesgo de diseminación de la infección en rodeos bovinos sanos. Con este fin se evaluó la presencia en semen de 3 toros naturalmente infectados con las subespecies relevantes en bovinos (Cff, Cfv y Cfvi). Teniendo en cuenta la capacidad de muchas especies bacterianas de colonizar glándulas accesorias, como las vesículas seminales, y luego ser eliminadas durante la eyaculación se estudió esta posibilidad en 2 de los toros (Cfv y Cfvi) tras seguimiento a faena, con el fin de conocer otro nicho para el *C. fetus*.

Se evidenció una alta presencia de *C. fetus* en semen, siendo detectada en los 3 toros (Cff, Cfv y Cfvi) por cultivo bacteriológico y/o IFD (**Tabla 10**). La detección de *C. fetus* por cultivo (91,5%) fue ampliamente mayor a la IFD (41,5%) en semen. Esto evidencia que la IFD de muestras clínicas de semen no son adecuadas para el diagnóstico de campilobacteriosis bovina. Y particularmente en el Toro-Cff fue el único toro donde no se detectó *C. fetus* en el último muestreo realizado. Mientras en los Toro-Cfv y -Cfvi, se identificó *C. fetus* en los cuatro muestreos realizados.

**Tabla 10.** Resultados de cultivo bacteriológico e IFD para detección de *C. fetus* de muestras de semen de tres toros naturalmente desafiados con *C. fetus* (CFF, CFV y Cfvi).

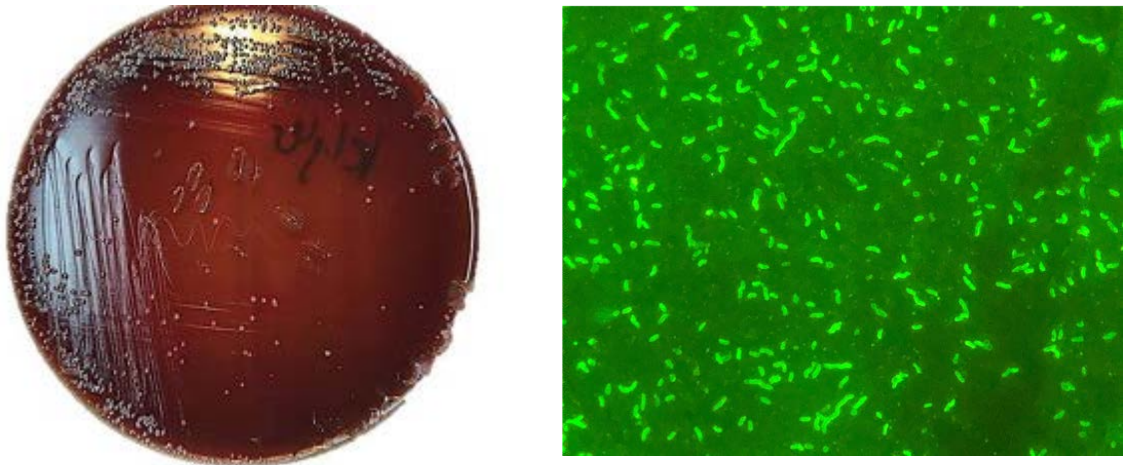
	Día de muestreo								Total muestras positivas	
	52		95		145		283		Cultivo	IFD
	Cultivo	IFD	Cultivo	IFD	Cultivo	IFD	Cultivo	IFD		
Toro-Cff	1	0	1	1	1	1	0	0	3	2
Toro-Cfv	1	0	1	1	1	1	1	0	4	2
Toro-Cfvi	1	0	1	0	1	1	1	0	4	1
Total positivos	3	0	3	2	3	3	2	0	11	5

IFD: inmunofluorescencia directa

Cff: *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*; Cfv: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*; Cfvi: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* biovar *intermedius*.

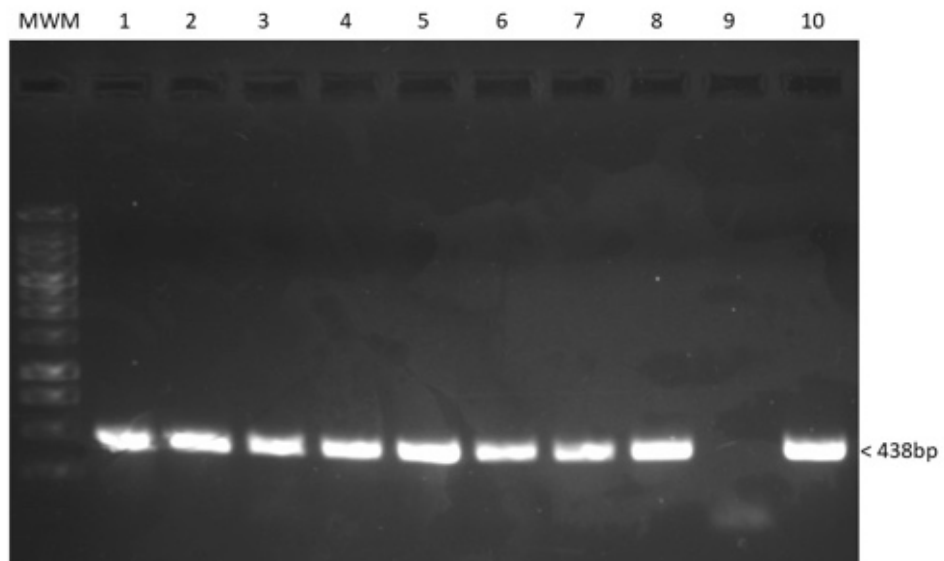
Finalizado el ensayo experimental descrito en el capítulo 1, se realizó el seguimiento a faena de los Toros-Cfv y -Cfvi (día 290). El Toro-Cff no fue enviado a faena siendo utilizado para otro ensayo que se describe en el capítulo 3. Tras la recolección de las muestras de glándulas sexuales accesorias (vesícula seminal,

glándulas bulbouretrales, ampollas y mucosa prepucial) del Toro-Cfv y -Cfvi durante la faena, *C. fetus* fue aislado de vesícula seminal del Toro-Cfv (**Fig. 19a**) y de la mucosa prepucial del Toro-Cfvi. La especie, *C. fetus*, fue confirmada por PCR (**Fig. 20**) e IFD de colonias obtenidas del cultivo bacteriológico de los tejidos correspondientes. La inmunofluorescencia positiva mostró diferentes formas del bacilo (espirilo largo, formas "S" y formas de gaviota) con intensa fluorescencia periférica de la estructura bacteriana, característica de *C. fetus* (**Fig. 19b**). Las muestras de mucosa prepucial del Toro-Cfv y de vesícula seminal del Toro-Cfvi resultaron negativas al cultivo bacteriológico, al igual que las muestras de glándulas bulbouretrales y ampollas de ambos toros.



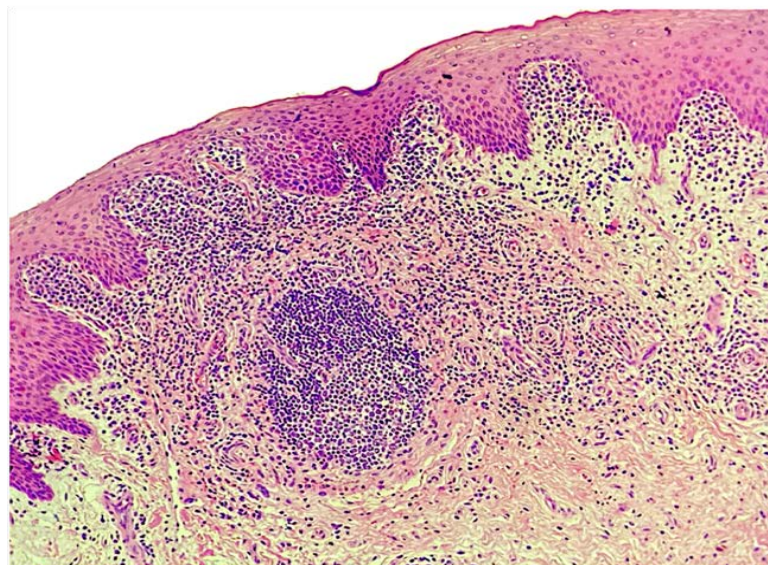
**Figura 19.** Toro-Cfv, vesículas seminales. A) Cultivo bacteriológico. Colonias de *Campylobacter fetus* en agar Skirrow. B) Inmunofluorescencia directa positiva de colonias del cultivo bacteriológico con fluorescencia y formas características de *C. fetus*. Microscopio epifluorescente, objetivo de inmersión en aceite, 1000x

A partir de las colonias compatibles con *Campylobacter* de muestras de semen se confirmó la especie *C. fetus* mediante PCR (**Fig. 20**).



**Figura 20.** 1591-PCR para confirmar *C. fetus*. Electroforesis representativa en gel de agarosa al 1,5%. Columna 1: Toro-Cfvi, mucosa prepucial; columna 2: Toro-Cfvi, semen (día 132); columna 3: Toro-Cfvi, semen (día 39); Columna 4: Toro-Cfvi, semen (día 269); columna 5: Toro-Cfv, vesícula seminal; columna 6: Toro-Cfv, semen (día 269); columna 7: Toro-Cfv, semen (día 82); columna 8: Toro-Cfv, semen (día 39); columna 9: control negativo (agua) y columna 10: control positivo (ADN purificado de *C. fetus* 97/608). MWM: marcador de peso molecular 1 Kb ladder (Promega).

Microscópicamente, en ambos toros (Cfv y Cfvi) se observó infiltrado linfoplasmocítico, periglandular y subepitelial, difuso, moderado (**Fig. 21**). Había múltiples agregados de linfocitos formando nódulos linfoides en el subepitelio. Ninguna de las glándulas accesorias sexuales recolectadas presentó lesiones de relevancia.



**Figura 21.** Toro-Cfvi, mucosa prepucial. Infiltrado linfoplasmocítico, subepitelial, difuso, moderado y nódulo linfóide focal subepitelial. H&E, 10x.

## 2.3 DISCUSIÓN

La campilobacteriosis puede transmitirse apartir de inseminación artificial con semen de toros infectados (Gard 2016; Givens 2018). Esto se produce en los centros de inseminación artificial tras la contaminación del semen durante su recolección de toros infectados o por utilizar el mismo material entre toros infectados y sanos (van Bergen et al. 2006; Givens y Marley 2008; Givens 2018; Seid 2019). La detección de *C. fetus* de muestras de semen y la infección de los toros se mantuvo durante todo en el ensayo para los Toro-Cfv y -Cfvi. En cambio, el Toro-Cff presentó permanencia temporal de la bacteria tanto en mucosa prepucial como en semen. En otros países, en centros de inseminación de toros se ha reportado con frecuencia el aislamiento de Cff en raspajes prepuciales con posterior contaminación del semen. A su vez en muestras de cultivos de materia fecal de esos toros no se aisló la bacteria, desestimando esta fuente como posible contaminante (van Bergen et al. 2006). Aunque los toros pueden infectarse de otras fuentes, como transmisión desde otros animales o contaminación del ambiente, debe tenerse en cuenta la posibilidad de ser portadores crónicos de Cff como ocurre con Cfv.

Aunque por el bajo número de toros no se puede estimar la precisión de los métodos diagnósticos utilizados, el cultivo bacteriológico resultó más eficaz que la IFD (100% vs 37%). Teniendo en cuenta que la baja tasa de detección obtenida por IFD podría estar sesgada por el bajo "n", el alto número de resultados falsos negativos también puede atribuirse a una baja concentración de la bacteria en semen y/o en la dificultad de observar *C. fetus* ya que los espermatozoides cubren la mayoría de la superficie del preparado presentando fluorescencia inespecífica. Estudios previos, han mostrado el uso de IFD en muestras prepuciales con rangos de detección de 69.4% a 92.59% (García Guerra et al. 2014; Marcellino et al. 2015; Campero et al. 2017; Silveira et al. 2018). Sin embargo, a nuestro conocimiento no hay reportes del uso de esta técnica en muestras de semen de toros, probablemente por su baja eficacia, como en el presente trabajo. Por el otro lado, la sensibilidad del cultivo bacteriológico de muestras prepuciales varía del 32.7% al 82.3% (García Guerra et al. 2014). La alta tasa de recuperación de *C. fetus* de semen en el presente estudio podría asociarse a la baja contaminación bacteriana en las muestras junto al tropismo de *C. fetus* a los espermatozoides (Cagnoli et al. 2020). Esto se evidenció con las 3 cepas de *C. fetus* (Cff, Cfv y Cfvi) en nuestro trabajo.



El análisis de muestras de tejido (mucosa prepucial y vesículas seminales) de los Toro-Cfv y -Cfvi evidenció infección por *C. fetus*. La presencia de *C. fetus* en las criptas prepuciales, así como en semen contaminado durante su recolección ha sido bien documentado (Givens y Marley 2008; Givens 2018). Sin embargo, no hay informes previos de infección de vesículas seminales de toro por *C. fetus* ni otros órganos reproductivos internos. La colonización de órganos sexuales internos puede limitarse a un solo órgano como en el presente caso, o diseminarse de forma extensiva hacia otros órganos como ampollas, glándulas bulbouretrales, entre otras (Peña Joya et al. 2010). Las vesículas seminales son un sitio importante para la localización de bacterias (*Brucella abortus*, *Trueperella pyogenes*, *Mycoplasma* spp., *Ureaplasma* spp., entre otras) en los toros, siendo las principales vías de infección bacteriana la vía hematogena o ascendente a través de la uretra (Hull y Vogel 2008; Lovelady 2013). Aunque se necesitan más estudios para conocer la patogenia y la implicancia de *C. fetus* en los órganos reproductores internos de los toros, dado su principal nicho en la cavidad del prepucio, sugerimos la ruta ascendente como se propone para otros patógenos, como *Tritrichomona foetus* (Cavaliere y Van Camp 1997; Lovelady 2013) de características clínico-epidemiológicas indistinguibles, o *Actinobacillus seminis* en carneros (Al-katib y Dennis 2014). El hallazgo de aislamiento ocasional de *C. fetus* de la uretra de toros (Eaglesome y Garcia 1992; Blaser et al. 2008) puede constituir una evidencia de una posible infección ascendente adicional donde la edad, la estimulación hormonal y el ambiente protector local podrían ser factores determinantes para lograr la infección de órganos sexuales accesorios. Otra teoría involucra la falta de sincronía de los eventos neurofisiológicos, lo que resulta en un reflujo de espermatozoides y orina hacia las glándulas vesiculares (Linhart y Parker 1988). Esto podría representar un caso raro de infección retrógrada como se observó en un toro naturalmente infectado con *T. foetus*, donde resultó con una infección de la vesícula seminal o la glándula prostática (Cavaliere y Van Camp 1997; Lovelady 2013). *C. fetus* en toros no se ha asociado con el desarrollo de anomalías genitales o síntomas clínicos (Michi et al. 2015). Sin embargo, diferentes estudios *in vitro* mostraron la adherencia de *C. fetus* a los espermatozoides de toros y sus efectos perjudiciales con detrimento de la calidad seminal, siendo un importante factor que contribuya a la subfertilidad causada por la bacteria (Chiapparone et al. 2016; Cagnoli et al. 2020). De manera similar, otro estudio mostró que Cff afecta la calidad del esperma en carneros (Bar et al. 2008). En condiciones *in vitro*, se reporta reducción de motilidad espermática, aglutinación y fagocitosis tras adherencia de *T. foetus* a espermatozoides, con consecuencias en la fertilidad (Benchimol et al. 2008; Ribeiro et al.



2010). Es necesario más estudios para clarificar posible eliminación en semen de *C. fetus* tras colonización de vesícula seminal, ya que podría indicar una de las causas de presencia de la bacteria en centros de inseminación con toros infectados, no solo estando asociada a contaminación de material por contacto con mucosa prepucial. Esto se observa en ciertas bacterias que se localizan en vesícula seminal y luego se eliminan en semen como ocurre con *Brucella abortus* (Eaglesome y Givens 1992; Eaglesome y García 1997; Givens 2018).

Los hallazgos microscópicos en prepucio de los Toros-Cfv y -Cfvi, caracterizados por infiltrado mononuclear subepitelial, se presenta en toros infectados por Cfv aunque no es característico de dicha infección (Michi et al. 2015). En muchos casos no hay lesiones asociadas (Foster 2016). Esta baja a nula reacción a la bacteria permite que habite el tracto reproductor macho por meses a años y prosperar ante ausencia de una respuesta inmunitaria efectiva. El estudio histológico reveló que no se observaron cambios macro ni microscópicos relevantes en ninguna de las glándulas sexuales accesorias de ambos toros infectados. Sin embargo, no deben descartarse cambios fisiológicos o incluso efectos a largo plazo. La ausencia o poca lesión tanto en mucosa prepucial como glándulas accesorias sexuales enfatiza la necesidad de la utilización de cultivo bacteriológico o pruebas moleculares para el diagnóstico de campilobacteriosis.

## 2.4 CONCLUSIÓN

La presencia de *C. fetus* en vesículas seminales abre el debate de los toros como portadores asintomáticos, un concepto bien establecido.

Futuros estudios son necesarios para conocer la patogénesis de *C. fetus* en órganos sexuales accesorios y su implicancia como posible nicho y posterior infección de semen. Esto podría implicar un riesgo para centros de inseminación de toros sin programas de control sobre *C. fetus*. El cultivo resultó una herramienta valiosa para el diagnóstico de campilobacteriosis en semen, siendo adecuadas para el control en dichas muestras.

Sería valioso estudiar en más toros infectados a campo la eliminación de *C. fetus* en semen junto al análisis de calidad del semen para ampliar el conocimiento del potencial efecto perjudicial de la bacteria sobre espermatozoides.

### CAPÍTULO 3

## ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO VENÉREO DE *CAMPYLOBACTER FETUS* SUBSP. *FETUS* EN MODELO BOVINO EXPERIMENTAL EN DOS ENSAYOS.

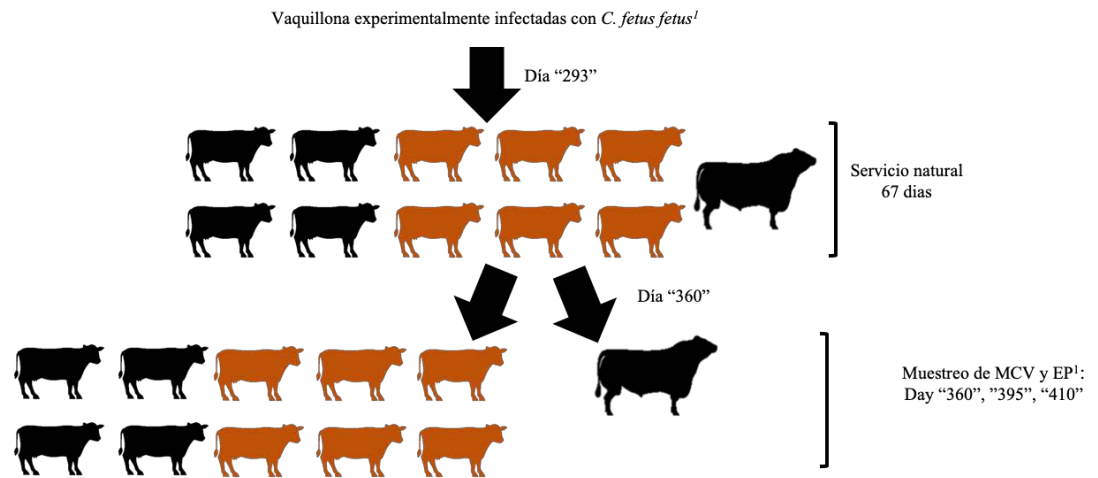
### 3.1 MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se describen dos ensayos: uno relacionado al ensayo del *Capítulo 1* siendo una continuación del mismo como ensayo exploratorio de la vía de transmisión sexual como posible vía de transmisión para Cff en bovinos (Ensayo CFF-1) y un segundo ensayo con animales nuevos para evaluar y corroborar esa transmisión sexual de Cff en bovinos (Ensayo CFF-2).

#### 3.1.1 Ensayo CFF-1

Tras el ensayo de dos etapas (DE y DN) del modelo experimental bovino desarrollado en el *Capítulo 1*, al día 293 pos-inoculación experimental de las vaquillonas, cuatro vaquillonas del GC y seis del GT-Cff fueron reintroducidas con el Toro-Cff en un potrero por 67 días para servicio natural (**Fig. 22**). Se recolectaron muestras de esmegma prepucial (EP) del toro y mucus cérvico-vaginal (MCV) de las vaquillonas en tres períodos posterior al servicio natural (día 360, 395 y 410), para cultivo bacteriológico e inmunofluorescencia directa (IFD). Las técnicas utilizadas fueron previamente descritas (*Capítulo 1, Materiales y Métodos; Estudios y Técnicas*).

Las seis vaquillonas correspondientes al GT-Cff habían resultado positivas por última vez al día 206 (n=1), día 241 (n=3) y día 285 (n=2) (*Capítulo 1, Resultados, Vaquillonas, Tabla 3 y Tabla complementaria 1*). Por su lado el Toro-Cff resultó negativo en 5 muestreos consecutivos a partir del día 145 por cultivo bacteriológico, qPCR e IFD (*Capítulo 1, Resultados, Toros, Tabla 5*).



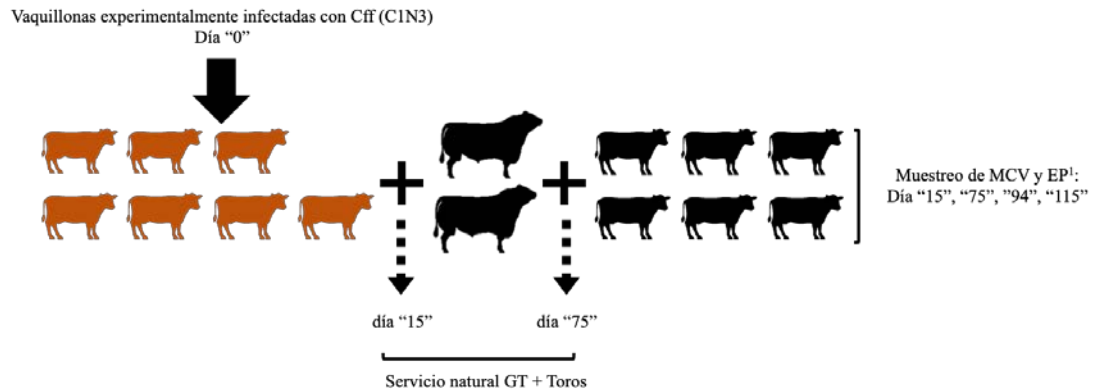
<sup>1</sup>Las muestras fueron procesadas por IFD y cultivo bacteriológico.

**Figura 22.** Esquema representativo de seis vaquillonas del GT-Xdd, 4 vaquillonas del GC y el toro-Xdd reintroducidos en un potrero por 67 días. Se detallan los tiempos de muestreo de MCV y EP. *Vaquillonas negras: vaquillonas del GC; Vaquillonas naranjas: vaquillonas del GT-Xdd; Toro negro: Toro-Cff*

### 3.1.2 Ensayo CFF-2

Se utilizaron 13 vaquillonas, raza Angus y Criolla, de 18 a 20 meses de edad, y dos toros, Aberdeen Angus, uno de tres años y otro de ocho años de edad (**Fig. 23**). Todos los animales fueron mantenidos en potreros con buena disponibilidad forrajera y agua *ad libitum* en la Reserva Ganadera N° 5 de la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Balcarce del INTA. Las vaquillonas y toros fueron previamente analizados para brucelosis y enfermedades de transmisión sexual (Campilobacteriosis y Tricomonosis) resultando negativas.

De las 13 vaquillonas se eligieron siete al azar, las cuales fueron desafiadas con la cepa Cff-C1N3 utilizando el mismo procedimiento que el realizado en el modelo experimental (Capítulo 1, *Materiales y Métodos, Inóculos para el desafío e infección experimental*), conformando el grupo desafiado (GT), un grupo sin desafiar de seis vaquillonas (GC) y dos toros sin desafiar. El momento de inoculación experimental del GT se consideró el día "0". Al día "15" pos desafío se introdujeron los dos toros para servicio natural por 60 días, y luego al día "75" se ingresaron las seis vaquillonas del GC, manteniendo los 15 animales (13 vaquillonas y dos toros) por 40 días más (día 115).



<sup>1</sup>Las muestras fueron procesadas por IFD y cultivo bacteriológico.

**Figura 23.** Esquema representativo de siete vaquillonas experimentalmente desafiadas (CFF-C1N3) (GT), dos toros y seis vaquillonas sin desafío (GC) para estudiar posible transmisión sexual de CFF. Se detallan los tiempos de muestreo de MCV y EP. *Vaquillonas naranjas: vaquillonas del GT; Toro negro: dos toros; Vaquillonas negras: vaquillonas del GC.*

El GT previo al desafío experimental recibió un protocolo de sincronización de ovulación, donde se les colocó un dispositivo intravaginal (DIV) con 1 g de progesterona (Laboratorio Sintex, Argentina) y se aplicó intramuscularmente 2 ml de benzoato de estradiol 0,1% (Laboratorio Sintex, Argentina). Luego de 8 días se retiró el DIV y se administró intramuscularmente 2 ml (500 µg) de Cloprostenol (PGF<sub>2</sub>α; Laboratorio Zoetis, Argentina). Además, se aplicó pintura para detección de celo en la base de la cola (Celotest, Laboratorio Biotay, Argentina) para determinar comportamiento de monta.

Se recolectaron muestras de MCV y EP de todos los animales en cuatro períodos desde el ingreso de los toros con el GT (día 15, 75, 94 y 115) para detección de *C. fetus* por cultivo bacteriológico e IFD (descrito en Capítulo 1, *Materiales y Métodos, Recolección de muestras de fluido genital*).

Adicionalmente, ya que Cff puede ser comensal del tracto gastrointestinal se realizó el muestreo de materia fecal de los 15 animales en tres períodos: al inicio del ensayo (día "0"), al ingresar las vaquillonas del GC (día "75") y al finalizar el ensayo (día 115). Se llevó a cabo con el fin de constatar presencia o ausencia de *C. fetus* en materia fecal, ya que puede ser contaminante de las secreciones genitales durante el muestreo de esas muestras, interfiriendo en la correcta interpretación de los resultados. Cada muestra de MF se analizó individualmente, se pesaron 5 g y se sembraron en 20 ml de caldo Bolton con antibióticos (OXOID CM0983, UK), se incubaron en estufa a 37°C durante 48 h bajo condiciones de microaerofilia (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> y 85% N<sub>2</sub>), y posteriormente se sembraron en agar Skirrow bajo estas mismas condiciones. Se examinaron durante 10 días cada 48 h. las colonias con

morfología compatible con *C. fetus* lisas, 1 a 2 mm de diámetro, convexas, blanco-grisáceas y translúcidas) se observaron en un microscopio de contraste de fases para constatar morfología bacteriana y el movimiento en tirabuzón característico del género *Campylobacter*. Estas colonias fueron repicadas a tubos con medio Kligler en pico de flauta para determinar la especie *C. fetus* sobre la base de la actividad de la enzima catalasa (positiva) y la producción de gas ácido sulfhídrico (negativa).

## 3.2 RESULTADOS

La subespecie Cff no es considerada como enfermedad venérea en toros, siendo un comensal del tracto gastrintestinal y asociada a abortos esporádicos tras translocación de la mucosa intestinal y diseminación sanguínea al útero grávido, infectando al feto. Sin embargo, se ha observado la capacidad de colonización y persistencia en el tracto reproductor de machos y hembras en estudios experimentales y el aislamiento de la subespecie en casos naturales de campo tanto de secreciones genitales como de fetos abortados. Esto llevó a estudiar con mayor profundidad la patogénesis de Cff y tener en cuenta la posibilidad que se comporte como enfermedad de transmisión sexual al igual que Cfv.

### 3.2.1 Ensayo CFF-1

En el primer ensayo, luego del período de servicio natural, en el primer muestreo de secreciones genitales al día 360, dos vaquillonas del GT-Cff, dos del GC y el Toro-Cff resultaron positivos a *C. fetus* por cultivo bacteriológico y/o IFD (**Tabla 11**). En el último muestreo al finalizar el ensayo (día 410), solo dos de las seis vaquillonas del GT estaban infectadas, de las cuales una persistió durante todo el período del ensayo. Las otras 4 vaquillonas debido a la característica autolimitante de la infección eliminaron la bacteria y se mantuvieron resistentes a una reinfección. Por su lado, aunque solo 2 vaquillonas se mantuvieron infectadas el toro se reinfectó tras ese servicio natural de 67 días. De importancia se destaca que de las cuatro vaquillonas correspondientes al GC, al menos dos resultaron infectadas con persistencia en una de al menos 50 días. Este ensayo exploratorio evidenció la reinfección del Toro-Cff y posterior transmisión de la subespecie a vaquillonas sanas.

**Tabla 11.** Resultados de cultivo bacteriológico e IFD para detección de *C. fetus* de muestras de esmegma prepucial de un toro y mucus cérvico vaginal de seis vaquillonas experimentalmente infectadas con Cff y cuatro vaquillonas del grupo control.

	Día pos desafío experimental						Total positivos	
	360		395		410		Cultivo	IFD
	Cultivo	IFD	Cultivo	IFD	Cultivo	IFD		
GT-Cff	2	1	1	0	1	0	4	1
GC	2	1	1	1	1	1	4	3
Toro-Cff	1	1	1	1	NP	NP	2	2
	5	3	3	2	2	1		

NP: no procesado

Cff: *Campylobacter fetus subsp. fetus*; IFD: inmunofluorescencia directa.

### 3.2.2 Ensayo CFF-2

Este segundo ensayo se desarrolló para corroborar los resultados observados en el Ensayo CFF-1 de tipo exploratorio, y que permita confirmar la capacidad venérea del Cff.

En la **Tabla 12** se resumen los resultados de las vaquillonas GT, GC y los toros por cultivo bacteriológico e IFD. En el desafío experimental cinco (71,5%) vaquillonas GT resultaron positivas (día 15). Luego del período de servicio natural (entre día 15 y 75), el toro de mayor edad resultó positivo a *C. fetus*. Tras la introducción del GC (día 75), se infectaron durante el servicio natural, en 19 días, cuatro vaquillonas (día 94). Finalmente resultaron infectadas durante el ensayo cinco de las vaquillonas del GT, el toro de mayor edad y cinco de las vaquillonas del GC, evidenciando el ciclo de transmisión sexual de Cff desde las vaquillonas infectadas al toro, y de este a vaquillonas sanas.

**Tabla 12.** Resultados de cultivo bacteriológico e IFD para detección de *C. fetus* de muestras de EP de dos toro y MCV de siete vaquillonas experimentalmente desafiadas (CFF) y seis vaquillonas sin desafío.

	Día pos inoculación experimental								Total muestras positivas	
	15		75		94		115		Cultivo	IFD
	Cultivo	IFD	Cultivo	IFD	Cultivo	IFD	Cultivo	IFD		
GT-Cff	5	1	5	1	1	0	2	0	13	2
GC	NP	NP	NP	NP	4	3	5	4	9	7
Toros-Cff	NP	NP	1	1	1	1	1	1	3	3
Total pos	5	1	6	2	6	4	8	5		

NP: no procesado

Cff: *Campylobacter fetus subsp. fetus*; IFD: inmunofluorescencia directa

Es bien conocida la presencia de *C. fetus*, particularmente de Cff, en materia fecal de vaquillonas y toros o en prepucio de toros tras contaminación fecal por

actividad homosexual. Por lo que es necesario estudiar este aspecto para clarificar si la transmisión Cff durante el ensayo fue por vía venérea o contaminación fecal. De las muestras de materia fecal, en ninguno de los tres períodos muestreados se identificó la presencia de *C. fetus*. Esto descarta la posibilidad de reacción cruzada de *C. fetus* por contaminación de las muestras de MCV y EP con materia fecal.

### 3.3 DISCUSIÓN

Las subespecies Cfv y Cff, son extremadamente cercanas genéticamente, donde Cfv representaría un clon “bovino” de Cff (van Bergen et al. 2005a). Aún así, existe una gran diferencia epidemiológica, siendo que Cff es capaz de infectar múltiples especies animales siendo en bovinos comensal del tracto gastrointestinal, a diferencia de Cfv que es exclusivo del bovino y del tracto reproductor del mismo, siendo causante de la enfermedad venérea campilobacteriosis genital bovina (CGB) (Michi et al. 2015; Sahin et al. 2017; Campero et al. 2017). En el presente estudio, mediante los dos ensayos se evidenció transmisión sexual de Cff en bovinos durante servicio natural.

En el *Ensayo CFF-1* (E1) de tipo exploratorio se corroboró que hembras infectadas con Cff pueden mantener la bacteria entre dos servicios y ser fuente de contagio para los toros. Estas vaquillonas GT resultaron en baja positividad probablemente porque durante los 9 meses de infección anterior (Capítulo 1) la mayoría logró eliminar el patógeno en cuestión y limpiarse, adquiriendo resistencia a una posible reinfección (Bon Durant 2005; Michi et al 2015). Aún así, dos vaquillonas se mantuvieron infectadas y en el siguiente servicio lograron la infección del toro y posterior infección de dos vaquillonas GC, evidenciando transmisión venérea. Esto evidencia el riesgo en sistemas de cría extensiva donde las vaquillonas pueden actuar como portadoras de Cff entre servicios como considerado con la subespecie Cfv (Bon Durant 2005; Campero et al. 2017).

El *ensayo CFF-2* (E2) refuerza el hecho de la capacidad de transmisión venérea de vaquillonas experimentalmente infectadas a toros sanos y de este a vaquillonas sanas, cumpliendo el ciclo para ser considerada enfermedad de transmisión sexual.

De los dos toros, solo se infectó uno lo cual pudo estar asociado a la edad avanzada de ese toro (8 años), donde la profundidad de los pliegues y criptas prepuciales se incrementa con la misma siendo un factor predisponente creando un nicho donde *C.*

*fetus* encuentra condiciones favorables y seguras para persistir, o por una posible actitud dominante por la misma cuestión etaria (Bon Durant 2005; Campero et al., 2017; Pena-Fernández et al 2021).

A diferencia de Cfv, Cff es reportada comensal del tracto gastrointestinal de bovinos causando abortos esporádicos, donde la vía de transmisión principal es la fecal-oral, bien conocida en ovinos (Kirkbride 1993; Mshelia et al 2010; Sahin et al. 2017; Silveira et al 2018; Balzan et al 2020). La patogénesis no está bien esclarecida en bovinos, sugiriendo en traslocación de Cff a través de la mucosa intestinal y bacteriemia llegando al útero grávido con consecuente infección fetal y aborto, principalmente en el tercer trimestre de gestación (Sahin et al 2017). La presencia de Cff en materia fecal de bovinos suele ser relativamente baja (<5%) (Hannon et al. 2009; Escher et al. 2016), pudiendo ser contaminante en el muestreo de secreciones genitales de vacas y toros e interferir en el diagnóstico. En nuestro ensayo se descartó la presencia de Cff en materia fecal, no existiendo contaminación cruzada.

A diferencia de Cff, Cfv es bien conocida por su transmisión venérea durante el servicio natural donde se genera la infección y colonización de la vagina con posterior llegada al feto vía ascendente provocando muerte embrionaria o aborto dependiendo de la edad de gestación (Bon Durant 2005; Campero et al 2017). Sugerimos esta misma vía pueda ocurrir para Cff, aunque en los presentes ensayos no se pudo corroborar abortos o baja preñez, teniendo en cuenta un “n” relativamente bajo.

A nuestro conocimiento, hay solo dos reportes donde consideran a Cff (previamente *C. fetus* subsp. *intestinalis*) como venéreo (Agumbah y Ogaa 1979; Campero et al. 1996). Estos reportes se basaron únicamente en las características fenotípicas, por lo que deberían revisarse para asegurar que esos aislamientos no hayan sido identificados erróneamente. Tras ambos ensayos llevados a cabo en el presente trabajo, y reforzado por datos registrados por el Grupo de Salud Animal de INTA EEA Balcarce donde Cff resultó una de las principales causas de abortos en bovinos (García, Paolicchi et al. 2021; Cantón et al. 2022) sugerimos la vía de transmisión sexual puede estar implicada en la patogénesis de Cff y debe ser considerada en el diagnóstico de la campilobacteriosis genital bovina (CGB) junto a Cfv y su biovar *intermedius*. Tanto los toros como vaquillonas pueden tener un rol en la diseminación y mantenimiento de Cff dentro de los rodeos, por lo que cualquier animal donde se identifique Cff debería ser eliminado para evitar posible diseminación de la infección.



Es necesario el estudio de más animales con distintas cepas de Cff y casos de campo para conocer relevancia epidemiológica e incidencia sobre performance reproductiva.

### **3.4 CONCLUSIÓN**

En el presente ensayo se observó la vía venérea como una vía de transmisión en bovinos con la cepa de *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* utilizada, al momento considerada una subespecie no capaz de transmitirse durante el servicio natural con toros.

Futuros estudios evaluando distintas cepas de Cff es esencial, sin embargo, la persistencia y transmisión venérea observada en los presentes ensayos hace necesario considerar al momento a la subespecie como parte de la CGB. Sugerimos que no debería diferenciarse sanitariamente un toro infectado por Cff o Cfv, realizando la misma medida de eliminación en ambos casos, para prevenir la diseminación de la infección en rodeos sanos.

## CONCLUSIONES GENERALES

El trabajo presentado evidencia un modelo experimental bovino para *C. fetus* exitoso para futuros estudios de campo y contribuye clarificando distintos aspectos de la patogénesis de las subespecies de *C. fetus* relevantes para el bovino y el diagnóstico molecular en distintas muestras.

Específicamente, evidencia la utilización de qPCR en muestras de esmegma prepucial como alternativa a métodos convencionales menos sensibles actualmente utilizados de rutina como la IFD. Respecto a la utilización de PCR en muestras de mucus cérvico vaginal (MCV), las características de dicha muestra denotan los inconvenientes que llevan a una baja eficiencia de los métodos moleculares, requiriendo mayores esfuerzos principalmente en la preparación de la muestra previo a la extracción de ADN. La utilización de un kit comercial para extracción de ADN resultó considerablemente mejor que el método In-house con lisis por calor, siendo este último no adecuado. Futuros estudios deben dirigirse a probar métodos de extracción de ADN que permitan diluir la consistencia viscosa manteniendo una calidad adecuada de ADN.

El traspaso de las técnicas moleculares de un ambiente experimental a casos naturales en muestras de MCV resultó frustrante. Sin embargo, el análisis de un número significativo de muestras, de distinta naturaleza y bajo distintos protocolos puede arrojar luz sobre el correcto procesamiento de las muestras. Mientras tanto, la utilización de MCV como muestras complementarias a muestras de esmegma prepucial de toros o tejidos de fetos bovinos abortados, en rodeos con posible infección con *C. fetus* es esencial para asegurar resultados confiables. En este sentido el estudio de fetos bovinos abortados resultaron de gran valor diagnóstico.

La presencia de *C. fetus* subsp. *venerealis* (Cfv) en órganos sexuales internos de un toro pone de manifiesto otra posible forma de persistencia de la bacteria en el animal. Sin embargo, es necesario, el estudio de más animales que permitan conocer la prevalencia y posible impacto en servicios naturales y centros de inseminación de bovinos.

La escasa información del Cfv biovar *intermedius* (Cfvi), y la alta colonización y persistencia en el modelo experimental aquí presentado destaca la necesidad que más estudios se dirijan a dicho biovar para proveer de información respecto a su grado de virulencia y patogenicidad en bovinos.

La capacidad de colonización y persistencia de *C. fetus* subsp. *fetus* (Cff) en el tracto reproductor de hembras y macho, junto a una alta presencia en fetos bovinos

abortados evidencian un rol importante de esta subespecie como enfermedad de la reproducción en bovinos. A su vez, se observó la capacidad de transmisión sexual de Cff en bovinos, al momento no considerada enfermedad venérea. Esto implica un riesgo en servicios naturales con toros infectados con Cff pero considerados negativos por no incluirse como venérea. Es esencial continuar el estudio de virulencia y patogénesis de más cepas de Cff que confirmen la relevancia clínico-epidemiológica de Cff en bovinos.

Para esto es necesario, mayor información del genoma completo de Cff, Cfv y Cfvi que permitan conocer secuencias específicas y diferenciar las mismas de forma correcta. Ya que, la diferenciación de subespecies mediante métodos bioquímicos y moleculares continúa confusa, no siendo confiable. La correcta identificación de subespecie permitirá conocer y clarificar la relevancia de cada subespecie, particularmente de Cff, en la salud reproductiva de los bovinos.

Tras los resultados presentados se sugiere incluir a Cff en el diagnóstico de campilobacteriosis genital bovina, hasta que se logre avanzar en una correcta diferenciación de subespecie y clarifiquen su patogénesis.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-glil, M.Y.; Hotzel, H.; Tomaso, H.; Linde, J. 2020. Phylogenomic analysis of *Campylobacter fetus* reveals a clonal structure of insertion element ISCfe1 positive genomes. *Front. Microbiol.* 11:1-12.
- Abril, C.; Vilei, E.M.; 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.
- 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):3052-3055.
- Agumbah, G.J.; Ogaa, J.S. 1979. Genital tropism and coital transmission of *Campylobacter fetus* subspecies *intestinalis*. *Br. Vet. J.* 135:83-91.
- Al-katib, W.A.; Dennis, S.M. 2014. Pathological changes in accessory sex organs of rams following experimental infection with *Actinobacillus seminis*. *N Z Vet J.* 56(6):319–325.
- Ali, A.; Soares, S.C.; Santos, A.R.; Guimaraes, L.C.; Barbosa, E.; Almeida, S.S.; Azevedo, V. 2012. *Campylobacter fetus* subspecies: comparative genomics and prediction of potential virulence targets. *Gene.* 508: 145-156.
- Anderson, M. 2007. Infectious causes of bovine abortion during mid- to late-gestacion. *Theriogenology.* 68:474-486.
- Balzan, C.; Ziech, R.E.; Gressler, L.T.; de Vargas, A.P.C. 2020. Bovine genital campylobacteriosis: main features and perspectives for diagnosis and control. *Ciênc. Rural.* 50(3):e20190272.
- Bar, T.Z.; Yehuda, R.; Hacham, T.; Krupnik, S.; Bartoov, B. 2008 Influence of *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* on ram sperm cell quality. *J Med Microbiol.* 57:1405-1410.
- Benchimol, M.; de Andrade Rosa, I.; da Silva Fontes, R.; Burla Dias, A.J. 2008. *Trichomonas* adhere and phagocytose sperm cells: adhesion seems to be a prominent stage during interaction. *Parasitol. Res.* 102: 597-604.
- Bidewell, C.A.; Woodger, N.G.A.; Cook, A.J.C.; Carson, T.V.; Gale, S.L.; Chanter, J.I.; Williamson, S.M. 2010. *Campylobacter fetus* subspecies *fetus* abortion in alpacas (*Vicuna pacos*). *Vet. Rec.* 167:457-458.
- Blaser, M.; Newell, D.; Thompson, S.; Zechner, E. 2008. Pathogenesis of *Campylobacter fetus*. In: Nachamkin, I.; Szymanski, C.M.; Blaser, M.J. (eds) *Campylobacter* (3<sup>rd</sup> ed.). ASM Press, Washington DC, pp.401-428.
- Bon Durant, R.H. 2005. Venereal disease of cattle: history, diagnosis, and the role of vaccines in their control. *Vet Clin Foo Anim.* 21:383-408.

- Botelho, M.P.A.; Hirsch, C.; Lage, A.P.; da Rocha, C.M.B.M.; Dorneles, E.M.S.; Cardoso, P.G.; da Costa, G.M. 2018. Prevalence of *Tritrichomona foetus* and *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* among bulls slaughtered in the state of Mina Gerais, Brazil. *Ciencias Agrarias*. 39(5): 2039-2048.
- Breyer, G.M.; Dias, M.E.; Henker, L.C.; Lorenzetti, M.P.; Baumbach, L.F.; Canal, C.W.; Pavarini, S.P.; Siqueira, F.M. 2021. *Campylobacter fetus* in abomasal fluid from spontaneously aborted bovine and ovine fetuses. *Acta Sci. Vet.* 49:1834.
- Cabell, E. 2007. Bovine abortion: aetiology and investigations. *In Practice*. 29: 455-463.
- Cagnoli, C.I.; Chiapparrone, L.; Cacciato, C.; Rodríguez, M.; Aller, J.F.; Catena, M.C. 2020. Effects of *Campylobacter fetus* on bull sperm quality. *Microb Pathog*. 149:104486.
- Calleros, L.; Betancor, L.; Iraola, G.; Mendez, A.; Morsella, C.; Paolicchi, F... Pérez, R. 2017. Assessing the intra-species genetic variability in the clonal pathogen *Campylobacter fetus*: CRISPRs are highly polymorphic DNA markers. *J. Microbiol. Methods*. 132:86–94.
- Campero, C.; Cipolla, A.; Medina, D.; Morsella, C.; Chayer, R.; Marcone, J.; Caracino, M.; Transmisión venérea de *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* mediante servicio natural en rodeos de cria de la Argentina. En: XV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias, Campo Grande, Brasil, octubre 1996.
- Campero, C.M.; Moore, D.P.; Anselmo, A.C.; Cipolla, A.L.; Odriozola, E. 2003. Aetiology of bovine abortion in Argentina. *Vet Res Comm*. 27:359-369.
- Camper, C.M.; Anderson, M.; Walker R.; Blanchard, P.; Barbano, L.; Chiu P... Cordeviola, J. 2005. Immunohistochemical identification of *Campylobacter fetus* in natural cases of bovine and ovine abortions. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 52:138–141.
- Campero, C.M. 2017. Campylobacteriosis genital bovina. En: Campero, C.M.; Cantón, G.J.; Moore, D.P. (eds.) *Abortos y otras pérdidas reproductivas en bovinos: diagnóstico y control*. Hemisferio Sur SA, Buenos Aires, Argentina, pp.79–86.
- Cantón, C.G.; Moreno, F.; Fiorentino, A.; Hecker, Y.; Spetter, M.; Fiorani, F... Moore DP. 2022. Spatial-temporal trends and economic losses associated with bovine abortifacients in central Argentina. *Trop. Anim. Health Prod*. 54(4):242.
- Cavaleri, J.; Van Camp, S.D. 1997. Bovine seminal vesiculitis: a review and update. *Veterinary Clinics of North America: Food Anim. Pract.* 13(2):233-241.
- Chaban, B.; Chu, S.; Hendrick, S.; Waldner, C.; Hill, J.E. 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*. 76:166–173.
- Chaban, B.; Garcia Guerra, A.; Hendrick, S.H.; Waldner, C.L.; Hill, J.E. 2013. Isolation rates of *Campylobacter fetus* subsp *venerealis* from bovine preputial samples via passive filtration on nonselective medium versus selective medium, with and without transport medium. *Am J Vet Res*. 74(8):1066e9.

- Chiapparrone, M.L.; Soto, P.; Catena, M. 2016 Characterization of the *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, adhesion to bovine sperm cells. *Int J Morphol.* 34(4):1419–1423.
- Cipolla, A.L.; Casaro, A.P.; Terzolo, H.R.; Estela, E.S.; Brooks, B.W.; García, M.M. 1994. Persistence of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* in experimentally infected heifers. *Vet Rec.* 134(24):628.
- Clark, B.L. 1971. Review of bovine vibriosis. *Aust Vet J.* 47:103-107.
- Clark, B.L.; Dufty J.H. 1978. Isolation of *Campylobacter fetus* from bulls. *Aust Vet J.* 54: 262-263.
- Clothier, K.; Anderson, M. 2016. Evaluation of bovine abortion cases and tissue suitability for identification of infectious agents in California diagnostic laboratory cases from 2007 to 2012. *Theriogenology.* 85(5):933-938.
- Cobo, R.E.; Morsella, C.; Cano, D.; Campero, M.C. 2004. Immunization in heifers with dual vaccines containing *Tritrichomonas foetus* and *Campylobacter fetus* antigens using systemic and mucosal routes. *Theriogenology.* 62:1367-1382.
- Corbeil, L.B.; Schurig, G.D.; Duncan, J.R.; Wilkie, B.N.; Winter, A.J. 1981. Immunity in the female bovine reproductive tract based on the response to *Campylobacter fetus*. *Adv Exp Med Biol.* 137:729-743.
- Cortes, M.E.; Gonzalez, F.; Vigil, P. 2014. Crystallization of bovine cervical mucus at oestrus: an update. *Rev Med Vet.* 28: 103–116.
- Delpiazzo, R.; Barcellos, M.; Barros, S.; Betancor, L.; Fraga, M.; Gil, J... Calleros, L. 2021. Accurate and fast identification of *Campylobacter fetus* in bulls by real-time PCR targeting a 16S rRNA gene sequence. *Vet. Anim. Sci.* 11:100163.
- de Oliveira, J.M.B.; da Silva, G.M.; Filho, A.F.B.B.; Borges, J.M.; de Oliveira, P.R.F.; Brandespim, D.F... Pinheiro Jr J.W. 2015. Prevalence and risk factors associated with bovine genital campylobacteriosis and bovine trichomonosis in the state of Pernambuco, Brazil. *Trop Anim Health Prod.* 47:549-555.
- Devenish, J.B.; Perry, K.; Milnes, D.; Burke, T.; McCabe, D.; Duff, S.; Lutze-Wallace, C. L. 2005. Validation of a monoclonal antibody-based capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Campylobacter fetus*. *Clin Diagn Lab Immuno.* 12(11):1261-8.
- Dingle, K.E.; Blaser, M.J.; Tu, Z.C.; Pruckler, J.; Fitzgerald, C.; van Bergen, M.A.P... Wagenaar, J.A. 2010. Genetic relationships among reptilian and mammalian *Campylobacter fetus* strains determined by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol.* 48:977–980.
- Eaglesome, M.; Garcia, M. 1992. Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen. Part 1. *Brucella abortus*, *Leptospira*, *Campylobacter fetus* and *Tritrichomonas foetus*. *Vet Bull.* 62:743-75.

- Eaglesome, M.D.; Garcia, M.M. 1997. Disease risks to animal health from artificial insemination with bovine semen. *Rev Sci Tech.* 16:215–225.
- Erickson, N.E.N.; Lanigan, E.; Waugh, T.; Gesy, K.; Waldner, C. 2017. Evaluation of long-acting oxytetracycline and a commercial monovalent vaccine for the control of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* infection in beef bulls. *Can Vet J.* 58:1051–1058.
- Escher, R.; Brunner, C.; von Steiger, N.; Brodard, I.; Droz, S.; Abril, C.; Kuhnert, P. 2016. Clinical and epidemiological analysis of *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* infections in humans and comparative genetic analysis with strains isolated from cattle. *BMC Infect. Dis.* 16:198.
- Farace, P.; Irazoqui, J.; Morsella C.; García J.A.; Mendez, M.; Paolicchi F.; Amadio A.; Gioffré A. 2021. Phylogenomics of *Campylobacter fetus*: A current approach to shed light on bovine genital campylobacteriosis infection in Argentina. *Vet World.* 14(5): 1165-1179
- Fenwick, S.G.; West, D.M.; Hunter, J.E.B.; Sargison, N.D.; Ahmed, F.; Lunsden, J.S.; Collet, M.G. 2000. *Campylobacter fetus fetus* abortions in vaccinated ewes. *N Z Vet J.* 48(5).
- Figueiredo, J.F.; Pellegrin, A.O.; Foscolo, C.D.; Machada, R.P.; Miranda, K.L.; Lage A.P. 2002. Evaluation of the direct fluorescent antibody test for the diagnosis of bovine genital campylobacteriosis. *Rev Latinoam Microbiol.* 44:118-123
- Fiorentino, A.; Stazionati, M.; Hecker, Y.; Morsella, C.; Cantón, G.J.; Harry, H.R... Bedotti, D. 2017. *Campylobacter fetus* subespecie *fetus* asociado a un brote de abortos ovinos. *RedVet.* 18(11):1-11.
- Foster, R.A. 2016. Male genital system. In: Maxie, M.G. (ed.). *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals.* 6th ed. Vol. 3. Elsevier, p.507.
- Gal, M.V.; Marfil, M.J.; Pasina, M.P.; Morsella, C.; Trangoni, M.; Zumárraga, M.J... Gioffré A. Caracterización de una nueva secuencia específica de *C. fetus*: aplicaciones para el diagnóstico molecular de la infección. In: Procedures III Litoral Biochemical Congress - XVI Argentine Conference on Microbiology. Santa Fe, Argentina, Agosto 2015.
- García, J.A.; Paolicchi, F.; Acuña, Y.; Fiorentino, A.; Malena, R.; Morsella, C... Morrell, E. 2021. Campylobacteriosis in beef fetuses: a descriptive study. En: XII Reunión Argentina de Patología Veterinaria, Octubre de 2021, Balcarce, Argentina.
- García, J.A.; Gioffré, A.K.; Acuña, J.; Méndez, M.A.; Morsella, C.; Aller, J.F.; Paolicchi, F.A. 2021. Isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* from seminal vesicle of a naturally challenged bull. *Vet Res Comm.* 45:447–452.
- García Guerra, A.; Chaban, B.; Hill, J.; Waldner, C.; Hendrick, S. 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(9):851-60.
- Gard, J. 2016. Bovine Genital Campylobacteriosis - A Review. *Int J Vet Sci Res.* 2(1): 029-031

- Givens, M.D.; Marley, M.S.D. 2008. Pathogens that cause infertility of bulls or transmission via semen. *Theriogenology*. 70:504–507.
- Givens, M.D. 2018. Review: Risks of disease transmission through semen in cattle. *Animal*. 12(1):165–171.
- Gorkiewicz, G.; Kienesberger, S.; Schober, C.; Scheicher, S.R.; Gully, C.; Zechner, R.; Zechner, E.L. 2010. A genomic island defines subspecies-specific virulence features of the host-adapted pathogen *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. *J Bacteriol*. 192:502–517.
- Groff, A.C.M.; Kirinus, J.K.; Sa e Silva, M.; Machado, G.; Costa, M.M.; Vargas, A.P.C. 2010. Polymerase chain reaction for the diagnosis of bovine genital campylobacteriosis. *Pesq Vet Bras*. 30(12):1031-1035
- Hannon S. J.; Allan, B.; Waldner, C.; Russell, M.L.; Potter, A.; Babiuk, L.A.; Townsend, H.G.G. 2009. Prevalence and risk factor investigation of *Campylobacter* species in beef cattle feces from seven large commercial feedlots in Alberta, Canada. *Can J. Vet. Res*. 73:275–282.
- Hosseinzadeh, S.; Kafi, M.; Pour-Teimouri, M. 2013. PCR detection of *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* in smegma samples collected from dairy cattle in Fars, Iran. *Vet. Res. Forum*. 4(4):227-231.
- Hull, B.; Vogel, S.R. 2008. Seminal Vesiculitis. *Vet Clin Food Anim*. 24:167–272.
- Hum, S.; Quinn, C.; Kennedy, D. 1994. Diagnosis of bovine venereal campylobacteriosis by ELISA. *Aust Vet J*. 71: 140-143.
- Hum, S., Quinn, K., Brunner, J., & On, S. L. W. 1997. Evaluation of a PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. *Aust Vet J*. 75 (11):827–831.
- Iraola, G.; Hernandez, M.; Calleros, L.; Paolicchi, F.; Silveyra, S.; Velilla, A... Pérez, R. 2012. Application of a multiplex PCR assay for *Campylobacter fetus* detection and subspecies differentiation in uncultured samples of aborted bovine fetuses. *J Vet. Sci.* 13(4):371–376.
- Iraola, G.; Pérez, R.; Betancor, L.; Marandino, A.; Morsella, C.; Méndez, A... Calleros, L. 2016. A novel real-time PCR assay for quantitative detection of *Campylobacter fetus* based on ribosomal sequences. *BMC Vet Res*. 12:286.
- Kienesberger, S.; Gorkiewicz, G.; Wolinski, H.; Zechner, E.L. 2011. New molecular microbiology approaches in the study of *Campylobacter fetus*. *Microb. Biotechnol.* 4(1):8–19.
- Kienesberger, S.; Sprenger, H.; Wolfgruber, S.; Halwachs, B.; Thallinger, G.G.; Perez-Perez, G.I... Gorkiewicz, G., 2014. Comparative genome analysis of *Campylobacter fetus* subspecies revealed horizontally acquired genetic elements important for virulence and niche specificity. *PLoS One*. 9:e85491. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0085491>.



- Kirkbride C.A. 1993. Bacterial agents detected in 10 year study of bovine abortions and stillbirths. *J Vet Diagn Invest.* 5:64-68.
- Linhart, R.D.; Parker, W.G. 1988. Seminal vesiculitis in bulls. *Compend Cont Ed Pract Vet.* 10:1429–1448.
- Littel, R.C.; Henry, P.R.; Ammerman, C.B. 1998. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J Anim Sci.* 76(4):1216- 31.
- Lovelady, A.S. 2013. *Evaluation of the accessory sex glands of the bull for the presence of Tritrichomonas foetus.* Thesis for degree of Master of Science. Alabama, United States. Faculty of Auburn University: 70p.
- Macías-Rioseco, M.; Caffarena, R.; Fraga, M.; Silveira, C.; Giannitti, F.; Cantón, G.; Hecker, Y.; Suanes, A.; Riet-Correa, F. 2019. Brote de abortos causado por *Campylobacter fetus* subespecie *venerealis* y *Neospora caninum* en un hato bovino lechero. *Rev Mex Cienc Pecu.* 10(4):1054-1063.
- MacLaren, A.P.C.; Agumbah, G.J.O. 1988. Infertility in cattle in south-west Scotland caused by an 'Intermediate' strain of *Campylobacter fetus* subspecies *fetus* (formerly *Campylobacter fetus intestinalis*). *Br Vet J.* 144: 29-44.
- Mahajan, V.; Banga, H.S.; Gupta, A. 2014. Immunohistochemical and molecular approaches for the diagnosis of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* in natural cases of bovine abortion. *Proc Natl Acad Sci, India, Sect B Biol Sci.* DOI 10.1007/s40011-014-0369-9
- Marcellino, R.; Morsella, C.; Cano, D.; Paolicchi, F. 2015. Eficiencia del cultivo bacteriológico y de la inmunofluorescencia en la detección de *Campylobacter fetus* en fluidos genitales bovinos. *Rev Argent Microbiol.* 47(3):183–189.
- 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 Methods.* 94:199–204.
- McMillen, I.; Fordyce, G.; Doogan, V.J. 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(3): 938-945.
- Mederos, A.; Galarraga, D.; van der Graas-van Bloois, L.; Buczinski, S. 2022. Performance of bovine genital campylobacteriosis diagnostic tests in bulls from Uruguay: a Bayesian latent class model approach. *Trop Anim Health Prod.* 54(1):32.
- Michi, A.N.; Favetto, P.H.; Kastelic, J.; Cobo, E.R. 2015. A review of sexually transmitted bovine trichomoniasis and campylobacteriosis affecting cattle reproductive health. *Theriogenology.* 85(5):781–791.
- Miles, A.; Misra, S.; Irwin, J. 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. *J Hyg (Lond).* 38(6):732-49

- Monke, H.J.; Love, B.; Wittum, T.E.; Monke, D.R.; Byrum, B.A. 2022. Effect of transport enrichment medium, transport time, and growth medium on the detection of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. *J Vet Diagn Invest.* 14:35-39.
- Monno, R.; Rendina, M.; Ceci, G.; Rizzo, C.; Luzzi, I.; Francavilla, A.; Ierardi, E. 2004. *Campylobacter fetus* bacteremia in an immunocompromised patient: case report and review of the literature. *New Microbiol.* 27:281–285.
- Monteserin, J.; Chayer, R.; Cabodevila, J.; Callejas, S. 2018. Uso de dispositivos intravaginales con progesterona en vaquillonas para producción de carne: efecto del rango horario en que se realiza la inseminación artificial a tiempo fijo. *Rev Inv Vet Perú.* 29(2): 575-579.
- Moolhuijzen, P. M.; Lew-Tabor, A.E.; Wlodek, B.M.; Agüero, F.G.; Comerci, D.J.; Ugalde, R.A... Bellgard, M. 2009. Genomic analysis of *Campylobacter fetus* subspecies: identification of candidate virulence determinants and diagnostic assay targets. *BMC Microbiol.* 9:86.
- Morrell, E. 2010. Caracterización diagnóstica de las causas infecciosas del aborto bovino. Tesis Doctoral. La Plata, Argentina. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, 160p.
- Morrell, E.; Barbeito, G.C.; Odeón, A.; Gimeno, E.; Campero, C. 2011. Histopathological, immunohistochemical, lectin histochemical and molecular findings in spontaneous bovine abortions by *Campylobacter fetus*. *Reprod Dom Anim.* 46:309-315.
- Morrell, E.; Campero, C.; Cantón, G.; Odeón, A.; Moore, D.P.; Odriozola, E.; Paolicchi, F.; Fiorentino, A. 2019. Current trends in bovine abortion in Argentina. *Pesqui Vet Bras.* 39(1):12-19.
- Mshelia, G.D.; Amin, J.D.; Woldehiwet, Z.; Egwu, G.O.; Murray, R.D. 2007. Bovine venereal campylobacteriosis: an overview. *CAB Rev: Perspect Agr Vet Sci Nutr Nat Resour.* 2(14).
- Mshelia, G.D.; Amin, J.D.; Woldehiwet, Z.; Murray, R.D.; Egwu, G.O. 2010. Epidemiology of bovine venereal campylobacteriosis: geographic distribution and recent advances in molecular diagnostic techniques. *Reprod Domest Anim.* 45:221–30.
- Nadin-Davis, S.A.; Chmra, J.; Carrillo, C.D.; Amoako, K.; Goji, N.; Ducepp, M.O.; Devenish, J. 2021. A comparison of fourteen characterized mammalian-associated *Campylobacter fetus* isolates suggests that loss of defense mechanisms contribute to high genomic plasticity and subspecies evolution. *PeerJ.* 9:e10586, DOI 10.7717/peerj.10586.
- Njaa, B.L. 2012. *Kirkbride's Diagnosis of Abortion and Neonatal Loss in Animals.* 4<sup>th</sup> ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 256p.
- Okuda, K.; Sakumoto, R.; Okamoto, N.; Acosta T.; Abe, H.; Okada, H...Skarzynski, D.J. 2010. Cellular localization of genes and proteins for tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF), TNF receptor types I and II in bovine endometrium. *Mol Cell Endocrinol.* 330:41–48.

- Oliveira Filho, R.B.; Malta, K.C.; Lucio, E.C.; Nascimento, G.G.; Dutra, L.C.; Mota, R.A.; Pinheiro Jr, J.W. 2018. Prevalence of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* in dairy cows from Brejo Paraibano, Brazil. *Acta Sci Vet.* 46:1526.
- On, S.L.W.; Harrington, C.S. 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
- Pena-Fernández, N.; Cano-Terriza, D.; García-Bocanegra, I.; Horcajo, P.; Vázquez-Arbaizar, P.; Cleofé-Resta, D... Collantes-Fernández, E. 2021. Prevalence of bovine genital campylobacteriosis, associated risk factors and spatial distribution in spanish beef cattle based on veterinary laboratory database records. *Front Vet Sci.* 8:75018.
- Peña Joya, M.A.; Góngora, A.; Jiménez, C. 2011. Infectious agents affecting fertility of bulls, and transmission risk through semen. Retrospective analysis of their sanitary status in Colombia. *Rev Colomb Cienc Pecu.* 24:634-646.
- Polo, C.; Garceia-Seca, T.; Hernández, E.; Fernández, V.; Rodríguez Lázaro, D.; Goyache, J.; Domínguez, L.; Pérez-Sancho, M. 2021. Evaluation of PCR assays for *Campylobacter fetus* detection and discrimination between *C. fetus* subspecies in bovine preputial wash samples. *Theriogenology*, 172:300-306.
- Raadstrom, P.; Knutsson, R.; Wolffs, P.; Loovenklev, M.; Lofstrom, C. 2004. Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples. *Mol Biotechnol.* 26:133-146.
- Ramos, A.D.A.; Guida, H.G.; Andrade, V.L.B. 1986. Comparison of three technics for collection of preputial samples for the diagnosis of campylobacteriosis. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 21(3):303-309.
- Ribeiro, C.; Falleiros, M.; Bicudo, S.; Araujo Junior, J.; Golim, M.; Silva Filho, F.; Padovani, C.; Modolo, J. 2010. *Tritrichomonas fetus* extracellular products decrease progressive motility of bull sperm. *Theriogenology.* 73:64-70
- Rocha, F.S.; Jesus, V.L.T.; Torres, H.M.; Gomes, M.J.P.; Figueiredo, M.J.; Nascimento, E.R.; Ferreira, T.; Aquino, M.H.C. 2009. *Campylobacter fetus* and *Tritrichomonas foetus* investigation in preputial mucous of bulls from Medio Paraiba/RJ Region, Brazil. *Ciencia Rural.* 39(5):1586-1589.
- Román, A.; de Jesús, R.; Figueroa, F.; Antonio, J.; Menchaca, P. 2014. Métodos de extracción de semen bovino. *RedVet.* 15(5):1-8.
- Ruckerbauer, G.M.; Malkin, K.; Mitchell, D.; Boulanger, P. 1974. Vibriosis: demonstration of *Vibrio fetus* and *Vibrio bubulus* organisms in preputial fluid by immunofluorescence and cultural techniques. *Can J Comp Med* 38: 321-327.
- Sahin, O.; Yaeger, M.; Wu, Z.; Zhang, Q. 2017. *Campylobacter*-associated diseases in animals. *Annu Rev Anim Biosci.* 5:21-42

- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd. Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Schlafer, D.H.; Foster, R.A. 2016. Female genital system. In: Maxie MG, ed. Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals. 6th ed. Vol. 3. Elsevier, p406–408.
- Sanhueza, J.M.; Heuer, C.; Jackson, R.; Hughes, P.; Anderson, P.; Kelly, K.; Walker, G. 2014. Pregnancy rates of beef cattle are not affected by *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* real-time PCR-positive breeding sires in New Zealand. NZ Vet J. 62:237–43.
- Schmidt, T.; Venter, E.H.; Picard, J.A. 2010. Evaluation of PCR assays for the detection of *Campylobacter fetus* in bovine preputial scrapings and the identification of subspecies in South African field isolates. JI S Afr Vet Ass, 81(2):87-92.
- Schulze, F.; Bagon, A.; Muller, W.; Hotzel, H. 2006. Identification of *Campylobacter fetus* subspecies by phenotypic differentiation and PCR. Journal of Clinical Microbiology. 44(6):2019–2024.
- Seid, A. 2019. Bovine campylobacteriosis and its economic importance: a review. Dairy and Vet Sci J. 11(2):555807.
- Silva, M.F.; Duarte, A.; Pereira, G.; Mateus, L.; Lopes-da-Costa, L.; Silva, E. 2020. Assessment of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* molecular diagnosis using clinical samples of bulls. BMC Veterinary Research. 16:410.
- Silva, M.F.; Pereira, A.L.; Fraqueza, M.J.; Pereira, G.; Mateus, L.; Lopes-da-Costa, L.; Silva, E. 2021. Genomic and phenotypic characterization of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* strains. Microorganisms. 9:340.
- Silveira, C.S.; Fraga, M.; Giannitti, F.; Macias-Rioseco, M.; Riet-Correa, F. 2018. Diagnosis of Bovine Genital Campylobacteriosis in South America. Front Vet Sci. 14(5):321.
- Soto, P.; Di Rocco, M.M. 1982. Diagnóstico de campylobacteriosis (vibriosis) en toros por la técnica de anticuerpos fluorescentes. Gac. Vet. 44(367):37-43.
- Spence, R.P.; Bruce, I.R.; McFadden, A.M.; Hill, F.I.; Tisdall, D.; Humphrey, S... Wagenaar, J, 2011. Cross-reaction of a *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* real-time PCR. Vet Rec. 168:131. 10.1136/vr.c5264
- Sprenger, H.; Zechner, E.L.; Gorkiewicz, G. 2012. So close and yet so far – molecular microbiology of *Campylobacter fetus* subspecies. European Journal of Microbiology and Immunology. 2(1):66-75.
- Sprenger, H.; Kienesberger, S.; Pertschy, B.; Pörtl, L.; Konrad, B.; Bhutada, P... Zechner, E.L. 2017. Fic Proteins of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* form a network of functional toxin–antitoxin systems. Front Microbiol. 8:1965. doi: 10.3389/fmicb.2017.01965.

- Struthers, J.D.; Lim, A.; Ferguson, S.; Lee, J.K.; Chako, C.; Okwumabua, O... Brower, A. 2021. Meningoencephalitis, vasculitis, and abortions caused by *Chlamydia pecorum* in a herd of cattle. *Veterinary Pathology*. 58(3): 549-557.
- Szymanska-Czerwinska, M.; Niemczuk, K. 2011. Detection of bovine genital campylobacteriosis in population of heifers of Polan. *Bull Vet Inst Pulawy*. 55:377-379.
- Tedesco, L.F.; Errico, F.; Del Baglivi, P.L. 1977. Comparison of three sampling methods for the diagnosis of genital vibriosis in the bull. *Aust Vet J*. 53:470-472.
- Terzolo, H.; Paolicchi, A.; Morelra, A.; Homse, A. 1991. Skirrow agar for simultaneous isolation of *Brucella* and *Campylobacter* species. *The Veterinary Record*. 129:531-532.
- Thrusfield, M. 1995. Diagnostic testing. En: Thrusfield M, *Veterinary Epidemiology*, 2nd edition, Blackwell Science, Cambridge, pp.:266-285.
- van Bergen, M.A.; Dingle, K.E.; Maiden, M.C.; Newell, D.I.; van der-Graaf van-Bloois, L.; Putten, J.; Wagenaar, J. 2005a. Clonal nature of *Campylobacter fetus* as defined by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol*. 43: 5888–5898.
- van Bergen, M.A.; Linnane, S.; van Putten, J.P.; Wagenaar, J.A.; 2005b. Global detection and identification of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. *Rev Sci Tech*. 24: 1017-26.
- van Bergen, M.A.P.; Simons, G.; van der Graaf-van Bloois, L.; van Putten, J.P.; Rombout, J.; Wesley, I.; Wagenaar, J.A. 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.
- van Bergen, M.A.; van de Graaf-van Bloois, L.; Visser, I.J.R.; van Putten, J.P.; Wagenaar, J.A. 2006. Molecular epidemiology of *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* on bovine artificial insemination stations using pulsed field gel electrophoresis. *Veterinary Microbiology*. 112:65-71.
- van de Graaf-van Bloois, L.; van Bergen, M.A.P.; van der Wal, F.J.; de Boer, A.G.; Duim, B.; Schmidt, T.; Wagenaar, J.A. 2013. Evaluation of molecular assays for identification *Campylobacter fetus* species and subspecies development of a *C. fetus* specific real-time PCR assay. *Journal of Microbiological Methods*. 95:93–97.
- van de Graaf-van Bloois, L.; Miller, W.G.; Yee, E; Rijnsburger, M.; Wagenaar, J.A.; Duim, B. 2014. Inconsistency of phenotypic and genomic characteristics of *Campylobacter fetus* subspecies requires reevaluation of current diagnostics. *Journal of Clinical Microbiology*. 52(12): 4183-4188.
- van der Graaf-Van Bloois, L. 2016. Molecular characterization and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. Doctoral thesis. Utrecht: Utrecht University. <http://dspace.library.uu.nl/handle/1874/342332>.

- Vargas, A.C.; Costa, M.M.; Vainstein, M.H.; Kreutz, L.C.; Neves, J.P. 2003. Phenotypic and molecular characterization of bovine *Campylobacter fetus* strains isolated in Brazil. *Veterinary Microbiology*. 93:121–132.
- Veron, M.; Chatelain, R. 1973. Taxonomic study of the genus *Campylobacter* Sebald and Veron and designation of the neotype strain for the type species, *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Veron. *Int J Syst Bacteriol*. 23:122–134.
- Wagenaar, J.A.; van Bergen, M.A.P.; Nlaser, M.J.; Tauxe, R.V.; Newell, D.G.; van Putten, J.P.M. 2014. *Campylobacter fetus* infections in humans: exposure and disease. *Clin Infect Dis*. 58(11):1579-1586.
- Waldner, C.; Hendrick, S.; Chaban, B.; Garcia Guerra, A.; Griffin, G.; Campbell, J.; Hill, J.E. 2013. Application of a new diagnostic approach to a bovine genital campylobacteriosis outbreak in a Saskatchewan beef herd. *Can Vet J*. 54:373–376.
- Willoughby, K.; Nettleton, P.F.; Quirie, M.; Maley, M.A.; Foster, G.; Toszeghy, M.; Newell, D.G. 2005. A multiplex polymerase chain reaction to detect and differentiate *Campylobacter fetus* subspecies *fetus* and *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis*: use on UK isolates of *C. fetus* and other *Campylobacter* spp. *Journal of Applied Microbiology*. 99:758–766.
- Wilson, I.G. 1997 Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 3741–3751.
- World Organisation for Animal Health. 2021. Bovine genital campylobacteriosis *In*: *Terrestrial Manual*. [https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/3.04.04\\_Campilobact\\_bovina.pdf](https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.04.04_Campilobact_bovina.pdf)
- Xavier, M.N.; Paixao, T.A.; Poester, F.P.; Lage, A.P.; Santos, R.L. 2009. Pathological, immunohistochemical and bacteriological study of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with *Brucella abortus*. *J Comp Path*. 140:149-157
- Yarohkno, Y. 2015. Diagnosis and vaccination for bovine genital campylobacteriosis in beef heifers. Tesis de Maestría del Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan. Departamento de ciencias clínicas en animales grandes.

## APÉNDICE

**Tabla complementaria 1.** Resultados positivos obtenidos mediante cultivo bacteriológico (n=240), IFD (n=216) y qPCR con extracción de ADN con kit (n=216) y con método In-house (n=96) a partir de muestras de mucus cérvico-vaginal de 24 vaquillonas experimentalmente infectadas con distintas cepas (Cff, Cfv y Cfvi) (8 por grupo).

ID vaq.	Cepa	Días pos-inoculación																																	
		14		38				61				95				117		145		178				206				241				285			
		C	qPCR		C	I	qPCR		C	I	qPCR		C	I	qPCR		C	I	qPCR		C	I	qPCR		C	I	qPCR		C	I	qPCR				
	K	IH			K	IH			K	IH			K	IH			K	IH			K	IH			K	IH			K	IH					
1	Cff	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-				
2		+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-				
3		+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+			
4		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
5		+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-			
6		+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-			
7		-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-			
8		+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-			
Subtotal		7	4	1	3	2	4	4	1	3	0	2	0	2	2	2	0	3	0	4	3	2	5	3	2	4	3	2	2	0	0	1			
1	Cfv	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
2		+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-			
3		+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
4		+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-			
5		+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
6		-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
7		-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-			
8		+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Subtotal		6	2	0	2	0	2	4	4	3	1	3	1	1	1	1	3	1	0	0	0	1	0	1	1	2	2	1	0	1	1	2	0		
1	Cfi	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-				
2		+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
3		+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-			
4		+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-		
5		+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-		
6		+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-		
7		+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-		
8		+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-		
Subtotal		8	5	4	4	6	4	8	5	4	0	1	1	1	1	2	4	2	3	1	4	1	2	4	5	2	7	7	3	5	3	4	0		
Total		21	11	5	9	8	10	16	10	10	1	6	2	4	4	5	9	3	6	1	8	5	4	10	9	6	13	11	5	8	4	6	1		

C: cultivo bacteriológico; I: IFD; K: método comercial de extracción de ADN kit InbioHighway; IH: Método extracción de ADN In House-LBT.

Cff: *Campylobacter* subsp.  *fetus fetus*; Cfv: *Campylobacter* subsp.  *fetus venerealis*. Cfvi: *Campylobacter* subsp.  *fetus* biovar *intermedius*.