



**INMUNOHISTOQUIMICA EN TEJIDOS FETALES BOVINOS PARA EL DIAGNOSTICO
DE *CAMPYLOBACTER FETUS* SPP.**

Maria Valeria Scioli

Monografía presentada como requisito parcial para optar por el Título de

ESPECIALISTA EN SALUD ANIMAL

Área de Producción Animal

Programa de Posgrado en Ciencias Agrarias

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA

Balcarce, Argentina

Diciembre de 2021

**INMUNOHISTOQUIMICA EN TEJIDOS FETALES BOVINOS PARA EL DIAGNOSTICO
DE *CAMPYLOBACTER FETUS* SPP.**

Maria Valeria Scioli

Supervisada por:

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'EM', is centered within a light gray rectangular box.

Tutor: Eleonora Morrell, MV, Dra.

**INMUNOHISTOQUIMICA EN TEJIDOS FETALES BOVINOS PARA EL DIAGNOSTICO
DE *CAMPYLOBACTER FETUS* SPP.**

Maria Valeria Scioli

Aprobada por:

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and lines, positioned below the text 'Aprobada por:'.

Evaluador: Juan Agustin Garcia, MV, Dr.

AGRADECIMIENTOS

Al Grupo de Sanidad Animal por motivarme para conseguir este logro.

A los Residentes, especialmente a Yamila y Facundo quienes me ayudaron con los cursos de posgrado.

A mi directora por confiar en mí.

INDICE GENERAL

1. Introducción	1
1.1. Epidemiología y patogenia	1
1.2. Signos clínicos	2
1.3. Diagnóstico	2
2. Materiales y métodos	4
2.1 Insumos	4
2.2 Selección de muestras	4
2.3 Técnica de Inmunohistoquímica	4
2.4 Descripción de las soluciones de inmunohistoquímica	5
3. Resultados	8
4. Discusión	10
5. Conclusión	13
6. Bibliografía	14

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Técnica de inmunohistoquímica. Portaobjetos ubicados en el rack para la absorción mediante capilaridad de la solución de bloqueo	7
Figura 2: Pulmón de un feto bovino abortado por <i>C. fetus</i> . Bronconeumonía mixta. H/E.400x	8
Figura 3: Feto bovino, abortado por <i>C. fetus</i> . Hepatitis periportal no supurativa. H/E.100x	8
Figura 4: Pulmón fetal bovino con inmunomarcación positiva a <i>C. fetus</i> en macrófagos intrabronquiolares, IHQ, 400X	9

INMUNOHISTOQUIMICA EN TEJIDOS FETALES BOVINOS PARA EL DIAGNOSTICO DE *CAMPYLOBACTER FETUS* SPP.

RESUMEN

La campylobacteriosis bovina es una enfermedad infecciosa que produce infertilidad y abortos en los rumiantes. Las principales especies implicadas son *Campylobacter fetus* spp. *venerealis* (CFV), *Campylobacter fetus* spp. *fetus* (CFF) y *Campylobacter jejuni*. El diagnóstico del aborto por campylobacteriosis en los fetos se realiza mediante el aislamiento de la bacteria en cultivos especiales y por inmunofluorescencia directa (IFD) a partir del contenido de abomaso y pulmón. La inmunohistoquímica (IHQ) es otra herramienta diagnóstica que permite realizar estudios retrospectivos y asociar de manera precisa el antígeno con las lesiones. Asimismo, esta técnica es relevante cuando los fetos se encuentran depredados, autolíticos y/o contaminados, ya que el cultivo bacteriológico es difícil o imposible de realizar. En este trabajo se realizó un análisis retrospectivo mediante IHQ en 19 muestras de pulmón e hígado, en cada caso, de fetos bovinos con diagnóstico previo de *C. fetus* por cultivo y/o IFD y con lesiones histopatológicas compatibles. Se empleó un kit de IHQ de alta sensibilidad y dos métodos de recuperación antigénica. Las lesiones histopatológicas más relevantes en los fetos fueron bronconeumonía supurativa o mixta (16/19), serositis no supurativa a nivel del intestino y pericardio (14/19), hepatitis periportal (14/19) y meningitis no supurativa (10/19). La inmunomarcación fue positiva a *C. fetus* en la totalidad de los pulmones (19/19) y negativa en todos los hígados (19/19) procesados; independientemente del método de recuperación antigénica. En base a estos resultados, suponemos que algún factor inherente al hígado fetal estaría actuando en detrimento de la IHQ para la identificación de *C. fetus*. Se demuestra que el pulmón es el órgano de elección para la inmunomarcación de *C. fetus* en los fetos bovinos abortados.

Palabras clave: inmunohistoquímica, *C. fetus*, tejidos fetales, bovino.

IMMUNOHISTOCHEMISTRY IN BOVINE FETAL TISSUES FOR THE DIAGNOSIS OF *CAMPYLOBACTER FETUS* SPP.

ABSTRACT

Bovine campylobacteriosis is an infectious disease that causes infertility and abortions in ruminants. The main species involved are *Campylobacter fetus* spp. *venerealis* (CFV), *Campylobacter fetus* spp. *fetus* (CFF) and *Campylobacter jejuni*. Diagnosis of abortion due to campylobacteriosis in fetuses is made by isolation of the bacteria in special cultures and by direct immunofluorescence (DFAT) from abomasal content and lung. Immunohistochemistry (IHC) is another diagnostic tool that allows retrospective studies and precise association of the antigen with the lesions. Likewise, this technique is relevant when fetuses are depredated, autolytic and/or contaminated, since bacteriological culture is difficult or impossible to perform. In this work, a retrospective analysis by IHC was performed on 19 lung and liver samples, in each case, from bovine fetuses with previous diagnosis of *C. fetus* by culture and compatible histopathological lesions. In contrast to previous studies, a highly sensitive IHQ commercial kit and two antigenic recovery methods were used. The most relevant histopathological lesions in the fetuses were suppurative or mixed bronchopneumonia (16/19), non-suppurative serositis at the level of the intestine and pericardium (14/19), non-suppurative periportal hepatitis (14/19) and meningitis (10/19). Immunolabeling was positive for *C. fetus* in all lungs (19/19) and negative in all livers (19/19) processed; regardless of the antigenic recovery method and IHC kit employed. Based on these results, we assume that some factor inherent to the fetal liver would be acting to the detriment of the IHC technique for the identification of *C. fetus*. It is demonstrated that the lung is the organ of choice for *C. fetus* immunolabeling in aborted bovine fetuses.

Key words: immunohistochemistry, *C. fetus*, fetal tissues, bovine.

1. INTRODUCCIÓN

La campylobacteriosis bovina es una enfermedad de origen bacteriano que produce infertilidad y abortos en los rumiantes (Skirrow 1994, Campero et al., 2017). Las principales especies implicadas en los abortos bovinos y ovinos son *Campylobacter fetus* spp. *venerealis* (CFV) [incluye el biovar *intermedius*], *Campylobacter fetus* spp. *fetus* (CFF) y *Campylobacter jejuni* (Anderson, 2007). Esta enfermedad infecciosa es de distribución mundial y provoca severas pérdidas económicas en la industria bovina y ovina de carne y leche afectando en forma negativa los índices reproductivos, afectando la tasa de destete en los rodeos (Campero et al., 2002, Campero et al., 2005). CFV es un patógeno de transmisión venérea exclusivo del bovino y reside en el tracto reproductivo de la hembra y en el prepucio del macho, asociada a infertilidad y abortos tempranos principalmente, enfermedad definida como campilobacteriosis genital bovina (CGB). Mientras que CFF se trasmite por vía oral y reside en el tracto intestinal de los bovinos y ovinos y por vía hematógica alcanza el feto provocando abortos esporádicos en la especie ovina y bovina (Anderson, 2007). En el caso de *C. jejuni*, al igual que CFF reside en el tracto intestinal y es una causa importante de abortos principalmente en la especie ovina (Yaeger et al., 2021) y ocasionalmente en bovinos (Campero et al., 2005).

1.2. Epidemiología y patogenia

CFV es transmitido en forma venérea, es decir, durante el servicio natural (coito) y también por inseminación artificial, ya que la bacteria puede sobrevivir en el semen durante el proceso de congelación y descongelación (Rossanigo et al., 1998; Givens 2018).

El toro es portador sano de la enfermedad y su capacidad reproductiva no se ve afectada pudiendo contraer la enfermedad durante el servicio con una vaca infectada (Clark 1971, Garcia and Brooks 1993 citado por Campero et al., 2017). La bacteria se aloja en las criptas prepuciales del toro, las cuales aumentan con la edad, motivo por el cual los toros más viejos tienen un rol importante en la transmisión de la enfermedad.

En las hembras CFV se localiza en el fondo de la vagina, cuello del útero y útero. En el útero la bacteria produce inflamación del endometrio y en algunos casos también cervicitis, salpingitis y vaginitis provocando una disminución de la tensión de oxígeno y de nutrientes esenciales para la sobrevivencia del embrión y consecuentemente mortalidad embrionaria (Catena, 2002; Terzolo y Catena, 2007). La categoría más vulnerable son las vaquillonas, debido a que no han tenido contacto previo con el agente, el nivel de anticuerpos es bajo y

desarrollan rápidamente la infección (Cipolla et al., 1992). La infección en la hembra suele ser autolimitante (entre los 3 a 6 meses), recuperando la fertilidad. Sin embargo, en algunos casos las hembras pueden ser portadoras crónicas de la enfermedad, siendo una fuente importante de contagio para el resto del rodeo (Campero et al. 2017).

La infección al feto puede llegar por la vía ascendente atravesando vagina y cérvix o por la vía hematogena en el caso particular de infecciones con CFF, luego de ingresar a través de intestino y atravesar placenta (Campero et al., 2003, Fiorentino et al., 2015, Campero et al., 2017).

1.3. Signos clínicos

La CGB es una enfermedad asintomática en los toros, donde no se ve afectada la libido ni la fertilidad. No hay alteración de la calidad del semen o anomalías genitales. Sin embargo, una vez que contraen la enfermedad los toros permanecen infectados toda su vida (Campero, 2005; Michi et al., 2016, Campero et al., 2017). En las hembras el signo predominante es la infertilidad que varía entre el 10 y 40% y se caracteriza por la repetición de celo a los 27- 60 días de iniciado el servicio, celos irregulares, pérdida embrionaria y fetal y mayor porcentaje de "cola de parición" (preñeces chicas), ocasionando bajas tasas de preñez (Rossanigo et al., 1998; Catena, 2002; Michi et al., 2016, Campero et al., 2017).

1.4. Diagnóstico

El diagnóstico de campylobacteriosis se debe realizar en los toros, vacas y fetos abortados cuando están disponibles. En los primeros la muestra de elección es el esmegma prepucial, en las hembras el mucus cérvico-vaginal (MCV) y en los fetos abortados el contenido de abomaso y órganos parenquimatosos (preferentemente pulmón, y placenta cuando está presente) (Terzolo et al., 1992, Terzolo y Catena, 2007). Las muestras mencionadas son sometidas a cultivo bacteriológico e Inmunofluorescencia Directa (IFD) siendo las técnicas más utilizadas para el diagnóstico de esta enfermedad (Hum et al., 1991, Terzolo et al., 1992; Silveira et al 2018). *C. fetus* es un microorganismo microaerófilo y su aislamiento resulta fastidioso ya que necesita ciertos requerimientos especiales en los medios de cultivo. Este hecho, sumado a que las muestras de esmegma prepucial y MCV generalmente se encuentran contaminadas con otras bacterias, determinan una baja sensibilidad diagnóstica mediante el cultivo (Marcellino et al., 2015). Contrariamente, las

muestras del feto abortado se consideran un buen material diagnóstico para el aislamiento de la bacteria debido a su condición de esterilidad y la alta concentración de *C. fetus* presentes tras infección (Terzolo et al., 1992). La IFD posee la desventaja de no permitir identificar la subespecie de *C. fetus* involucrada en comparación con la PCR (Hum et al., 1997, Schulze et al., 2006), pero dicha técnica junto con el cultivo son las que se emplean con mayor frecuencia para el diagnóstico de campylobacteriosis (Campero et al., 2017; Silveira et al 2018).

La inmunohistoquímica (IHQ) se ha transformado en los últimos años en una herramienta diagnóstica esencial en el área de patología. Sus principales ventajas son la facilidad para el procesamiento y remisión de muestras, permitiendo realizar estudios retrospectivos de casos con diagnóstico histopatológico y la asociación precisa entre el antígeno con las lesiones y los tipos celulares involucrados. Sin embargo, la estandarización de la IHQ es laboriosa y la calidad de los resultados depende de varios factores como el tiempo de fijación, el procesamiento de los tejidos, desenmascaramiento de epitopes (o recuperación antigénica), sensibilidad de los sistemas de detección y calidad de los anticuerpos empleados (Vosse et al., 2007, Kammerer et al., 2007, Woon Kim et al., 2016, de Dios Soler y Acosta Haab, 2018).

En el presente trabajo se realizó un estudio retrospectivo en muestras de pulmón e hígado de fetos bovinos con diagnóstico previo de *C. fetus*, por cultivo e IFD, y con lesiones histopatológicas compatibles. Se empleó un kit comercial de IHQ y dos métodos de recuperación antigénica para lograr la inmunomarcación de la bacteria en ambos tejidos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Insumos

Kit: Envision: Dako EnVision + System-HRP (DAB), K4011
Anticuerpo primario: dilución 1:300 (Laboratorio de Azul, Azul, Argentina)
PBS: Sigma 1000-3 pH7.4 a 25°C 12 pks.
Pepsina: Sigma P7000 x 100 gr.
Caseína: Sigma C-5890 X500 gr.

2.2 Selección de las muestras

Se realizó un estudio retrospectivo a partir de tejidos incluidos en parafina provenientes de 19 fetos bovinos naturalmente abortados con diagnóstico de campylobacteriosis mediante aislamiento (cultivo bacteriológico) e IFD, y presencia de lesiones histológicas compatibles. Los fetos bovinos habían ingresado al Servicio de Diagnóstico Veterinario Especializado del INTA EEA Balcarce donde se procesaron en forma rutinaria para el diagnóstico del aborto (Morrell et al., 2019). Para el análisis histopatológico, de cada espécimen se recolectaron todos los órganos los cuales fueron fijados durante 48 horas en formol bufferado al 10%, procesados e incluidos en tacos de parafina, seccionados, montados y teñidos con hematoxilina y eosina (Campero et al., 2003, Morrell et al., 2019). Para la aplicación de la técnica de inmunohistoquímica se seleccionaron muestras de hígado y de pulmón de todos los fetos bovinos analizados. Para validar los resultados se incluyeron controles positivos y negativos de los tejidos y del anticuerpo primario.

2.3. Técnica de inmunohistoquímica

Para esta técnica se utilizó un kit comercial Dako EnVision + System-HRP (DAB), K4011 (Dako, Carpintería, CA, USA).

Las muestras de hígado y pulmón incluidas en los tacos de parafina fueron seccionadas a 5 micras de espesor con un micrótopo (Leica RM 2125 RTS), luego se montaron en los portaobjetos y se incubaron en estufa a 50°C durante 36 a 48 horas. Para desparafinar los tejidos se realizaron 3 lavados de xilol de 5 minutos cada uno para luego comenzar con la hidratación realizando 3 baños de alcohol 100° de 2 minutos cada uno, 2 baños de alcohol 96° de 2 minutos cada uno, 1 baño de alcohol 70° de 2 minutos y 1 baño en agua destilada.

Posteriormente se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena (solución A) durante 5 minutos, se lavaron los portaobjetos con las muestras correspondientes en PBS (solución B). Posteriormente a este paso se llevó a cabo la recuperación antigénica mediante dos métodos: enzimático y por calor: En la recuperación antigénica enzimática se incubaron las muestras en pepsina (solución C) durante 15 minutos a 37° a baño maría. En la recuperación antigénica por calor, los portaobjetos fueron incluidos en citrato (solución D) y expuestos a 100 °C durante 20 minutos en microondas. Luego de la recuperación antigénica (independientemente del método utilizado), los portaobjetos se lavaron en PBS 5 minutos, en agua destilada otros 5 minutos y luego colocados en el rack de capilaridad (Figura 1).

Se realizó la absorción por capilaridad con la solución de bloqueo (solución E), la cual se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Escurrimos la solución E y colocamos el anticuerpo primario (Laboratorio de Azul, Azul, Argentina) en una dilución 1/300 incubando el mismo a 37°C durante 45 minutos en cámara húmeda. Se lavó en PBS y se colocó el anticuerpo secundario (provisto por el Kit) incubándose a 37°C durante 30 minutos en cámara húmeda. Se lavaron nuevamente los portaobjetos en PBS durante 5 minutos.

Se preparó el cromógeno DAB (solución F) unos 20 minutos previos a la absorción del mismo y se dejaron incubar los portaobjetos durante 1 minuto a temperatura ambiente sin luz directa. Se realizó el lavado en PBS durante 5 minutos, luego en agua destilada y se retiraron los portaobjetos del rack de capilaridad para pasarlos a una canastilla.

Se utilizó la coloración con hematoxilina activada (Biopur) durante 5 minutos, como tinción de contraste, se lavaron los portaobjetos en agua corriente durante 2 minutos, luego enjuagando en alcohol ácido, agua amoniacal y por último en agua corriente.

Finalmente se hizo la deshidratación mediante 3 baños de alcohol 96° durante 1 minuto cada uno, 2 baños de alcohol 100° durante 1 minuto cada uno y aclaramos con 2 baños de xilol de 1 minuto cada uno. Se montaron los portaobjetos con bálsamo de Canadá (Biopur) y colocaron los cubre objetos.

2.4. Descripción de las soluciones de inmunohistoquímica

A) Solución bloqueadora de peroxidasa

Peróxido de hidrógeno al 3%

B) Solución de PBS

Agua destilada 800 ml

Cloruro de sodio	80 gr
Cloruro de potasio	2 gr
Fosfato disódico	14.4 gr
Fosfato monopotásico	2.4 gr

Llevar a 1 lt con agua destilada y ajustar PH a 7.4. Autoclavar.

C) Recuperación antigénica con pepsina

Agua destilada	150 ml
CLH 1N	1,5 ml de
Pepsina	0,6 gr

D) Recuperación antigénica con citrato 0.01M pH7

Agua destilada	1800ml
Acido cítrico monohidrato	4.2 gr

Ajustar a pH7 con NaOH 2M. Añadir agua destilada hasta volumen final de 2000ml

E) Solución de bloqueo

PBS pH 7.2	1000ml
Caseína	5 gr
Timerosal	0,5 gr
Tween	1ml

Dejar una noche en el agitador para que se disuelva la caseína, ajustar a pH 7.4 luego de disolver. Guardar en heladera y sacar alícuotas para usarla.

F) Cromógeno DAB

- 1ml de sustrato
- 1 gota de cromógeno

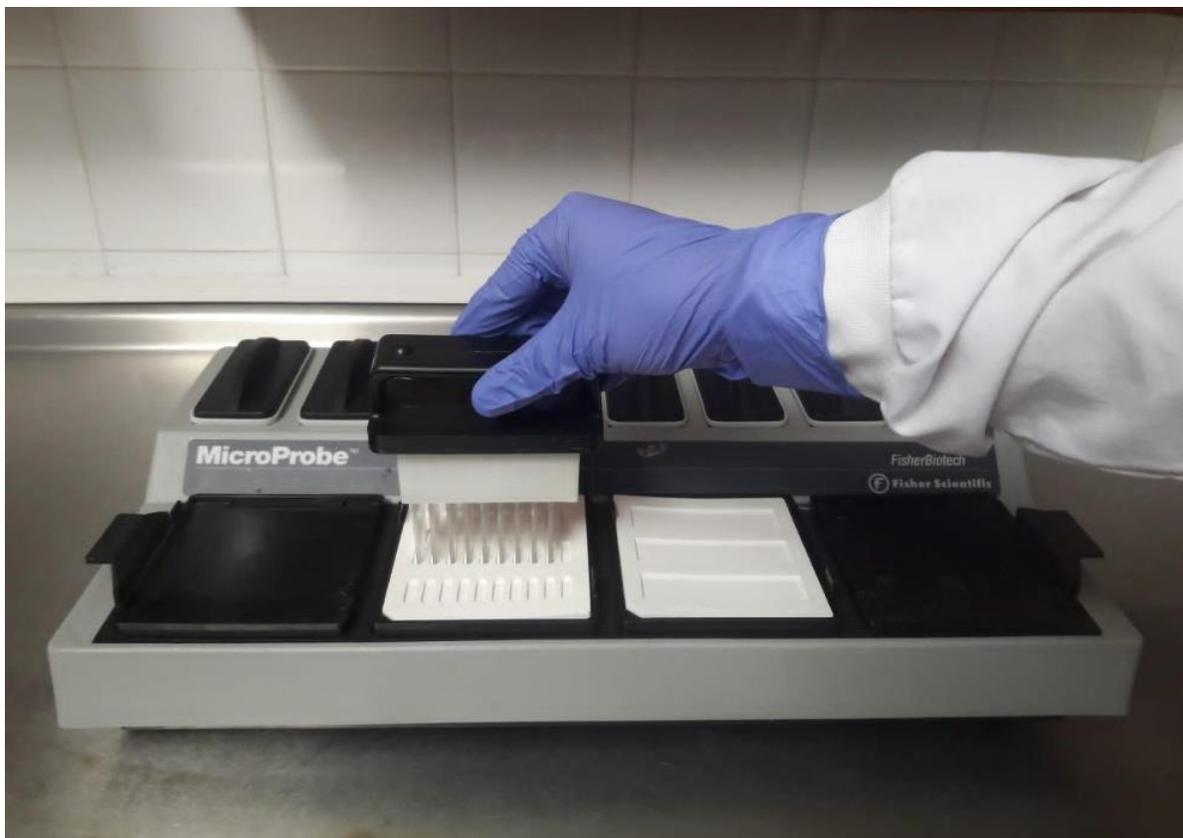


Figura 1. Técnica de inmunohistoquímica. Portaobjetos ubicados en el rack para la absorción mediante capilaridad de la solución de bloqueo

3. RESULTADOS

Las lesiones histopatológicas más relevantes en los fetos bovinos con diagnóstico de campylobacteriosis fueron bronconeumonía supurativa o mixta (Figura 2), serositis no supurativa a nivel del intestino y pericardio, hepatitis periportal no supurativa (Figura 3), y meningitis no supurativa (Tabla 1). Otras lesiones histopatológicas que se hallaron en menor frecuencia fueron: hepatitis multifocal necrotizante (2/19), enteritis no supurativa (7/19), miocarditis no supurativa (4/19) y glositis no supurativa (4/19). En un solo caso en el que se remitió la placenta se observó placentitis necrosupurativa severa con vasculitis. La técnica de IHQ fue positiva a *C. fetus* en la totalidad de los pulmones fetales (19/19) y negativa en los 19 hígados, independientemente del método de recuperación antigénica utilizado (Tabla 1). La inmunomarcación a *C. fetus* en los pulmones se visualizó principalmente en el interior de los macrófagos alveolares e intrabronquiolares (Figura 4) y ocasionalmente en los macrófagos presentes en los tabiques alveolares y espacio intersticial interlobulillar.

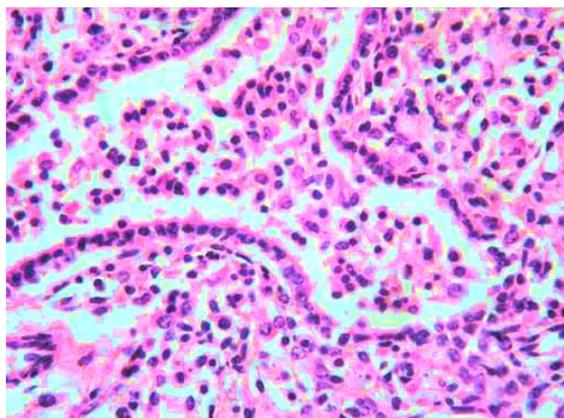


Figura 2. Pulmón de un feto bovino abortado por *C. fetus*. Bronconeumonía mixta. H/E.400x

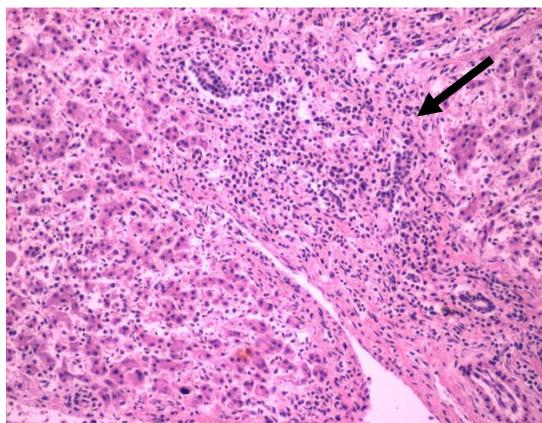


Figura 3. Feto bovino abortado por *C. fetus*. Hepatitis periportal no supurativa. H/E.100x

Tabla 1. Principales lesiones histopatológicas y resultados de la técnica de IHQ con dos métodos diferentes de recuperación antigénica en 19 fetos bovinos abortados por *C. fetus*.

Lesiones histopatológicas				IHQ Recuperación antigénica con pepsina		IHQ Recuperación antigénica con calor	
meningitis	neumonía	hepatitis	serositis	Hígado	Pulmón	Hígado	Pulmón
10/19	16/19	14/19	14/19	0/19	19/19	0/19	19/19

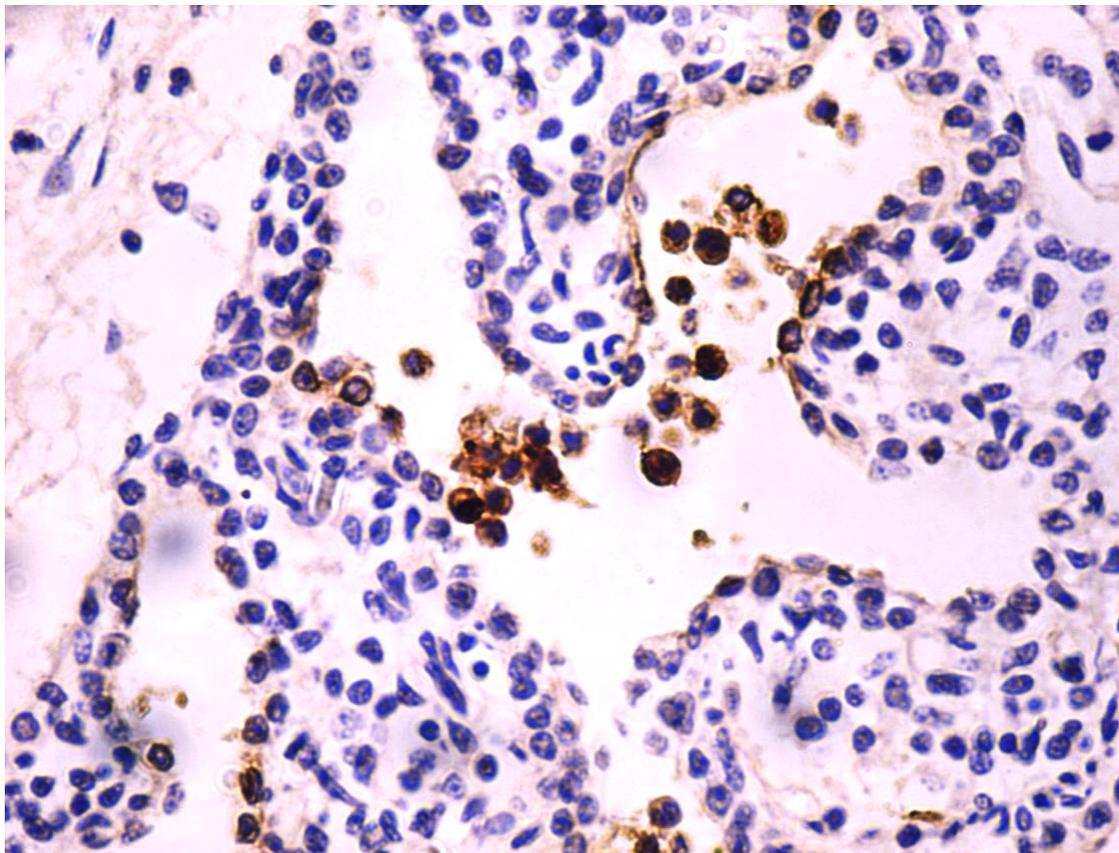


Figura 4. Pulmón fetal con inmunomarcación positiva a *C. fetus* en macrófagos intrabronquiolares. IHQ, 400X

4. DISCUSIÓN

En el presente trabajo las lesiones histopatológicas que se hallaron con mayor frecuencia en los fetos abortados por *C. fetus* coinciden con las descritas en trabajos previos (Anderson, 2007, Campero et al., 2003, Morrell et al., 2019). La inmunomarcación resultó positiva a *C. fetus* en la totalidad de los pulmones analizados y negativa en todos los hígados empleando sistema EnVision. Estos resultados son similares a los obtenidos por Campero, Anderson et al. (2005) quienes utilizaron un kit de IHQ basado en el sistema de detección de avidina-biotina. Este método comparado con el sistema de detección En Vision posee menor sensibilidad, debido a que la presencia de ciertas enzimas de los tejidos puede interferir con la reacción de revelado, creando coloraciones inespecíficas de fondo (en inglés "background") que dificultan la visualización del antígeno (Vosse et al., 2007). Esto puede ocurrir particularmente en el hígado ya que es un tejido rico en biotina, por lo tanto, cuando se utiliza la IHQ con el método de avidina-biotina es recomendable realizar el bloqueo previo con estas enzimas (Woon Kim et al., 2016). Las ventajas del sistema En Vision en comparación con otros métodos de detección para IHQ reside en su rapidez, es simple y sensible y puede realizarse tanto en tejidos parafinados como congelados (Vosse et al., 2007, Kammerer et al., 2007). Asimismo, se ha demostrado que con este sistema ciertos anticuerpos primarios permiten una mayor dilución con lo cual se reducirían los costos de la técnica (Sabatini et al., 1998).

La recuperación antigénica es un paso muy importante en la IHQ debido a que permite exponer los epitopes del antígeno para que sean reconocidos por el anticuerpo primario. Este paso es crucial principalmente cuando los tejidos han sido fijados durante varias horas, pues el formol tiene la capacidad de formar enlaces cruzados intermoleculares que enmascaran al antígeno. La recuperación antigénica mediante el empleo de enzimas proteolíticas (pepsina, proteinasa K, tripsina, etc) se utilizan en baja frecuencia, por la dificultad que ofrecen para estandarizar y optimizar los protocolos de trabajo (Corominas 1997, de Dios Soler y Acosta Haab, 2018). En cambio, la recuperación antigénica inducida por calor (HIER del inglés "Heat Induce Epitope Retrieval") mediante el empleo del microondas es uno de los métodos más utilizados, y consiste en incluir las muestras en soluciones tampón (con un pH determinado) y a una temperatura determinada. Una de las

principales desventajas de la HIQR con microondas que pueden influir en el resultado final, es el calentamiento irregular o excesivo de las muestras que pueden determinar la pérdida de antigenicidad (Woon Kim et al., 2016).

Otro factor importante en la IHQ es la elección del anticuerpo primario, por el impacto significativo que tiene con respecto a la sensibilidad y especificidad de la técnica. Un anticuerpo primario ideal debe ser altamente sensible, altamente específico y reproducible (Woon Kim et al., 2016, de Dios Soler y Acosta Haab, 2018). Los anticuerpos policlonales se unen con distintos epitopes del antígeno y tienen una alta sensibilidad ya que si alguno de los epitopes se destruye durante el procesamiento quedarán otros que serán reconocidos. Las desventajas de estos anticuerpos es la mayor incidencia de reacciones cruzadas, es decir inespecificidad. La diferencia con los anticuerpos monoclonales es que reaccionan a un solo epítipo del antígeno debido a que son el producto de un clon único de células plasmáticas. Son altamente específicos y menos sensibles que los anticuerpos policlonales, pero el uso de los mismos puede recompensarse con el empleo de sistemas de detección de alta sensibilidad y amplificación (de Dios Soler y Acosta Haab, 2018).

El diagnóstico del aborto para *C. fetus* generalmente es exitoso mediante el aislamiento de la bacteria en el feto a partir del contenido de abomaso o del pulmón (Campero et al., 2003, Morrell et al., 2019) o a partir de las muestras de esmegma prepucial y MCV (Campero et al., 2002, Anderson 2007, Silveira et al., 2018). Sin embargo, con estas últimas, es necesario realizar una recolección limpia y cuidadosa y emplear un medio de transporte específico para evitar su contaminación. Por otro lado, el cultivo de la bacteria es fastidioso y requiere para el aislamiento un ambiente de microaerofilia con medios selectivos para su crecimiento (Anderson, 2007). La principal ventaja de la técnica de IHQ es que permite identificar al antígeno asociado a lesiones y resulta relevante para el diagnóstico del aborto por campylobacteriosis cuando los fetos se encuentran depredados, autolíticos y/o contaminados, ya que en estas circunstancias el cultivo bacteriológico es difícil o resulta imposible de realizar. A pesar de estas ventajas, la IHQ es una técnica compleja, en la cual el resultado final está influenciado por múltiples parámetros (tiempo de fijación, métodos de detección, recuperación antigénica y selección del anticuerpo primario). Para que la IHQ sea de máxima utilidad y los resultados obtenidos sean reproducibles y confiables es imprescindible estandarizar cada uno de los pasos mencionados utilizando controles positivos y negativos tanto de los tejidos como de los anticuerpos primarios para la valoración de los resultados finales.

En estudios previos (Campero, Anderson et al., 2005, Morrell et al., 2011) se emplearon los mismos anticuerpos policlonales de *C. fetus* que en el presente trabajo, pero no se incluyó el sistema En Vision de alta sensibilidad (Kammerer et al., 2001) ni los métodos de recuperación antigénica que fueron aplicados en el presente estudio. A pesar de estas modificaciones, la inmunomarcación en el tejido hepático resultó negativa en todos los fetos analizados, a diferencia del pulmón en el cual se observó una señal intensa y positiva a *C. fetus* en citoplasma de macrófagos intrabronquiolares y ocasionalmente en los macrófagos de los tabiques alveolares y del espacio intersticial interlobulillar.

En base a lo expuesto, suponemos que algún factor inherente al tejido hepático actuó en detrimento de la técnica de IHQ para identificar a *C. fetus*. Probablemente la mayor vulnerabilidad del hígado a la autólisis fetal, o la presencia de lesiones como hepatitis periportal o necrosis, causaron daño a la bacteria determinando la pérdida de antigenicidad y el resultado negativo de la IHQ. Por otra parte, no habría que descartar factores como el elevado contenido de hemoglobina hepática o la presencia de enzimas endógenas que pudieron haber influido negativamente en la inmunomarcación de este agente infeccioso. La inmunomarcación de *C. fetus*, en un solo tejido fetal asociada a la lesión microscópica, es suficiente para confirmar el diagnóstico del aborto, por lo tanto, en base a los resultados obtenidos en el presente trabajo consideramos que el pulmón es el órgano de elección. Se recomienda para futuros estudios continuar con la estandarización de distintos protocolos de recuperación antigénica para lograr la inmunomarcación de *C. fetus* en el hígado debido a la frecuencia de lesiones que se observan en el mismo, lo que permitiría aumentar la eficiencia diagnóstica.

5. CONCLUSIÓN

La IHQ es una técnica relevante en el diagnóstico del aborto bovino por campylobacteriosis cuando el cultivo y/o IFD no son factibles de realizar. El pulmón es el órgano de elección para la inmunomarcación de *C. fetus* en los fetos bovinos abortados. Hasta el presente no se ha podido identificar a la bacteria mediante IHQ en los hígados fetales, por lo que creemos que algún factor inherente a este tejido estaría actuando en detrimento de la técnica.

BIBLIOGRAFIA

- Anderson, M. (2007). Infectious causes of bovine abortion during mid- to late-gestation. *Theriogenology* 68, 474-486.
- Campero, C.M. (2002). Enfermedades venéreas de los bovinos. Eficiencia productiva del rodeo de cria. *IDIA* 21: 127-131.
- Campero, C.M.; Moore, D.P.; Odean, A.C.; Cipolla, A.L.; Odriozola, E. (2003). Aetiology of bovine abortion in Argentina. *Vet. Res. Commun.* 27:259-369.
- Campero, C.M. (2005). Consideraciones sobre la Tricomonirosis y Campylobacteriosis bovina. *Revista del Colegio de Veterinarios de la Provincia de Buenos Aires* 10(32): 47-51.
- Campero, C.M.; Anderson, M.L.; Walker, R.L., Blanchard, P.C.; Barbano, L.; Chiu, P., Martinez, A.; Combessies, G.; Bardon, J.C.; Cordeviola, J..(2005) Immunohistochemical identification of Campylobacter fetus in natural cases of bovine and ovine abortion. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public. Health* 52: 138-141.125..
- Campero, C.M.; Canton, G.J.; Moore, D.P. (2017). Abortos y otras pérdidas reproductivas en bovinos. 1ª ed. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Hemisferio Sur, pp.79-84.
- Catena, M.C. (2002). Campylobacteriosis genital bovina: Inmunopatogenia de la mortalidad embrionaria. Tesis Doctor en Ciencia Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del centro de la provincia de Buenos Aires.
- Cipolla, A.L.; Campero, C.M.; Terzolo, H.R.; Paolicch, F.A. (1992). Enfoque actual sobre campylobacteriosis (vibriosis) genital bovina. *INTA. EEA Balcarce. Producción Animal. Información para Extensión* N° 2.
- Clark, B.L.(1971). Review of bovine vibriosis. *Aust. Vet. J.* 47:103-107.
- Corominas, J.M. (1997) Desenmascaramiento y recuperación de antígenos en inmunohistoquímica.. *Técnicas de inmunohistoquímica* 30 (1):73-77 <http://www.conganat.org/seap/revista/v30-n1/14.pdf>
- de Dios Soler, M.; Acosta Haab, G. (2018). Guía de inmunohistoquímica para técnicos. 1a ed. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Instituto Nacional del Cáncer [Archivo PDF] *Ministerio de Salud de la República Argentina* <https://bancos.salud.gob.ar/recurso/guia-de-inmunohistoquimica-para-tecnicos>
- Fiorentino, M.A.; Hecker, Y.; Morsella, C.; Canton, G.; Stazionati, M.; Romero Harris, H.; Bedotti, D. (2015). Campylobacter fetus subespecie fetus asociado a un brote de abortos en ovinos. 9º Seminario de la Fundación "Charles Louis Davis". Patología de los pequeños rumiantes y camélidos sudamericanos. 23-25 de septiembre. Facultad de Ciencias Agrarias y Veterinarias. Universidad Católica. Salta, Argentina..
- García, M.M.; Brooks, B.W. (1993). Campylobacter. In: Gyles CL, Thoen CO. Eds. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 2nd ed. Iowa state university, Ames pp. 262-272.

- Givens, M.D. (2018). Risks of disease transmission through semen in cattle. *Animal* 12(1):165–171.
- Hoffer, M. (1981). *Campylobacteriosis*. *Can. Vet. J.* 22:327- 330.
- Hum, S.; Stephens, L.R.; Quinn, C..(1991). Diagnosis by ELISA of bovine abortion due to *Campylobacter fetus*. *Aust. Vet. J.* 68:272-275.
- Hum, S.; Quinn, K.; Brunner, J.; On, SLW (1997). Evaluation of a PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. *Aust. Vet. J.* 75, 827–831.
- Kämmerer, U.; Kapp, M.; Gassel, A.M.; Richter, T.; Tank, C.; Dietl, J.; Ruc, P. (2001). A New Rapid Immunohistochemical Staining Technique Using the EnVision Antibody Complex. *J. Histochem. Cytochem.* 49(5): 623–630.
- Marcellino, R.A.; Morsella, C.G.; Cano, D.; Paolicchi, F.A. (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..
- Michi, A.N.; Favetto, P.H.; Kastelic, J.; Cobo, E.R. (2016). A review of sexually transmitted bovine trichomoniasis and campylobacteriosis affecting cattle reproductive health. *Theriogenology*. 85, 781-791.
- Morrell, E.L.; Barbeito, C.G.; Odeon, A.C.; Gimeno, E.J.; Campero, C.M. (2011). Histopathological, Immunohistochemical, Lectin histochemical and Molecular Findings in Spontaneous Bovine Abortions by *Campylobacter fetus*. *Reprod. Dom. Anim.* 46, 309–315.
- Morrell, E.L.; Campero, C.M.; Cantón, G.; Odeón, A.C.; Moore, D.P.; Odriozola, E.; Paolicchi, F.; Fiorentino, M.A. (2019). Current trends in bovine abortion in Argentina. *Pesq. Vet. Bras.* 39(1):12-19.
- Rossanigo, C..(1998). Las enfermedades venéreas en los rodeos de cría; prevalencia, diagnóstico y control. *Oeste Ganadero*, 1 (2), 22-24.
- Sabatini E, Bisgaard K, Ascani S, Poggi S, Piccioli M, Ceccarelli C, Pieri F, Fraternali-Orcioni G, Pileri S. (1998). The EnVision + system: a new immunohistochemical method for diagnostics and research. Critical comparison with the APAAP, ChemMateT, CSA, LABC, and SABC techniques. *J.Clin. Pathol.* 51:506-511.
- Silveira, C.S.; Fraga, M.; Giannitti, F.; Macías-Rioseco, M.; Riet-Correa, F.(2018). Diagnosis of bovine genital campylobacteriosis in South America. *Front. Vet. Sci.* 5: 321.
- Schulze, F.; Bagon, A.; Muller, W.; Hotzel, H.(2006). Identification of *Campylobacter fetus* Subspecies by Phenotypic Differentiation and PCR. *J.Clin. Microbiol* 44(6):2019-24.
- Skirrow, M.B. (1994). Diseases due to *Campylobacter*, *Helicobacter* and related bacteria. *J. Comp. Pathol.* 111:113-149.
- Terzolo, H.R.; Argento, E.; Catena, M.C.; Cipolla, A.L.; Martinez, A.H.; Tejada, G.; Villa, C.; Betancor, R.; Campero, C.M.; Cordeviola, J.M.; Pasini, M.I. (1992). Procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de campylobacteriosis y Trichomoniasis genital bovina. Documento de la Comisión Científica Permanente de Enfermedades Venéreas de los Bovinos. INTA. EEA Balcarce. 33p

- Terzolo, H.R.; Catena, M.C. (2007). Género *Campylobacter*. *En: N.O. Stanchi; et al. (eds.) Microbiología Veterinaria. 1a ed. Intermédica, pp. 274-280.*
- Vosse, B.A.; Seelentag, W.; Bachmann, A.; Bosman, F.T.; Yan, P. (2007). Background staining of visualization systems in immunohistochemistry: comparison of the Avidin-Biotin Complex system and the EnVision+ system. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. 15(1):103-107.*
- Woon Kim, S.; Chan, J.R.; Park, S. (2016). Immunohistochemistry for Pathologists: Protocols, Pitfalls, and Tips. *J. Pathol. Transl. Med. 50: 411-418.*
- Yaeger, M. J.; Sahin, O.; Plummer, P.J.; Wu, Z.; Stasko, J.A.; Zhang, Q. (2021). The pathology of natural and experimentally induced *Campylobacter jejuni* abortion in sheep. *J. Vet. Diagn. Invest. 1-10.*