

# MÉTODOS DIAGNÓSTICOS ACTUALES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LA CAMPYLOBACTERIOSIS GENITAL BOVINA

FONSECA MOLINA, David Eduardo<sup>1</sup>  
CASTRO CRUZ, Jefferson Abdelo<sup>2</sup>

Artículo de Revisión  
Recibido: 07/06/2017  
Aceptado: 19/08/2017

## RESUMEN

La campylobacteriosis genital bovina es una enfermedad venérea de los bovinos de distribución mundial, que causa grandes pérdidas económicas en las ganaderías, sus agentes etiológicos son *Campylobacter fetus fetus* que ocasiona infecciones del tracto digestivo de ovinos y bovinos, y *campylobacter fetus venerealis* que se aloja en el tracto reproductivo de hembras y machos. Entre los factores de riesgo, se encuentra la monta directa, presencia de pequeños rumiantes en las ganaderías y el no cumplimiento de las medidas de bioseguridad. Esta enfermedad es asintomática en los toros, pero en las hembras ocasiona disminución en la tasa de preñez, abortos y muerte embrionaria. El aislamiento de la bacteria es el método más efectivo para la identificación de las subespecies de *Campylobacter fetus*, pero es una técnica que conlleva tiempo y trabajo, debido a sus altos requerimientos y desarrollo lento. La inmunofluorescencia, la inmunohistoquímica y la reacción en cadena de la polimerasa, son técnicas que actualmente mejoran su identificación, ya que poseen una alta especificidad y sensibilidad a *Campylobacter fetus*, optimizando la evaluación de poblaciones bovinas con alta densidad. El propósito de la revisión, es describir los métodos actuales para la identificación de la enfermedad en la ganadería bovina, y así poder tomar medidas preventivas y curativas para el control de esta patología.

**Palabras clave:** aborto, embrionaria, inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, PCR, reabsorción.

- 1 Estudiante de Medicina Veterinaria, Fundación Universitaria Juan de Castellanos, defonseca@jdc.edu.co.
- 2 MVZ. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Especialista en Biotecnologías de la Reproducción y M.Sc. Ciencias Veterinarias, Universidad de la Salle. Docente Facultad de Ciencias Agrarias y Ambientales, Fundación Universitaria Juan de Castellanos, jacastro@jdc.edu.co.

## CURRENT DIAGNOSTIC METHODS FOR THE IDENTIFICATION OF BOVINE GENITAL CAMPYLOBACTERIOSIS

### ABSTRACT

Bovine genital campylobacteriosis is a venereal disease of cattle of world distribution, which causes great economic losses in livestock, its etiological agents are *Campylobacter fetus* that causes digestive tract infections of sheep and cattle, and *campylobacter fetus venerealis* that is lodged in the reproductive tract of females and males. Risk factors include direct mating, presence of small ruminants in livestock and non-compliance with biosecurity measures. This disease is asymptomatic in the bulls, but in the females, it causes a decrease in the rate of pregnancy, abortions and embryo death. Bacteria isolation is the most effective method for identifying subspecies of *Campylobacter fetus*, but it is a time-consuming and labor-intensive technique due to its high requirements and slow development. Immunofluorescence, immunohistochemistry and polymerase chain reaction are techniques that currently improve their identification, since they have high specificity and sensitivity to *Campylobacter fetus*, by optimizing the evaluation of bovine populations with high density. The purpose of the review is to describe the current methods for the identification of the disease in cattle farming, and so be able to take preventive and healing to control this pathology.

**Keywords:** abortion, embryo, immunohistochemistry, immunofluorescence, PCR, reabsorption.

## LES MÉTHODES DE DIAGNOSTIC ACTUELLES POUR L'IDENTIFICATION DE LA CAMPYLOBACTÉRIOSE GÉNITALE BOVINE

### RÉSUMÉ

La campylobactériose génitale bovine est une maladie vénérienne des bovins de distribution mondiale, qui provoque de grandes pertes économiques chez le bétail, ses agents étiologiques sont *Campylobacter foetus* qui cause des infections des voies digestives des ovins et des bovins, et le *campylobacter venerealis* qui s'introduit dans le système génital des femelles et des mâles. Les facteurs de risque comprennent l'accouplement direct, la présence de petits ruminants dans le bétail et le non-respect des mesures de biosécurité. Cette maladie est asymptomatique chez les taureaux, mais chez les femelles, elle occasionne une diminution du taux de grossesse, d'avortement et de mort embryonnaire. L'isolement des bactéries est la méthode la plus efficace pour identifier les sous-espèces de *Campylobacter foetus*, mais c'est une technique qui prend beaucoup de temps et de travail en raison des exigences élevées et du lent-développement. L'immunofluorescence, l'immunohistochimie et la réaction en chaîne de la polymérase sont des techniques qui améliorent actuellement leur identification, puisqu'elles sont très spécifiques et sensibles au foetus *Campylobacter*, en optimisant l'évaluation des populations de bovins ayant une densité élevée. L'objectif de la révision est de décrire les méthodes actuelles d'identification de la maladie dans l'élevage bovin, et donc de pouvoir prendre des mesures préventives et curatives pour le contrôle de cette pathologie.

**Mots-clés:** avortement, embryonnaire, immunohistochimie, immunohistochimie, immunofluorescence, PCR, réabsorption.

## MÉTODOS DIAGNÓSTICOS ATUAIS PARA A IDENTIFICAÇÃO DA CAMPILOBACTERIOSE GENITAL BOVINA

### RESUMO

A campilobacteriose genital bovina é uma doença venérea dos bovinos em todo o mundo, causando grandes perdas econômicas nos animais, seus agentes etiológicos são o *Campylobacter fetus fetus*, que causa infecções do trato digestivo de ovinos e bovinos, e o *Campylobacter fetus venereal*, alojado em trato reprodutivo de fêmeas e machos. Entre os fatores de risco, destacam-se a fixação direta, a presença de pequenos ruminantes na pecuária e o não cumprimento das medidas de biossegurança. Esta doença é assintomática em touros, mas nas fêmeas causa uma diminuição na taxa de gravidez, abortos e morte embrionária. O isolamento da bactéria é o método mais eficaz para a identificação das subespécies do *Campylobacter fetus*, mas é uma técnica que demanda tempo e trabalho, devido aos seus altos requisitos e desenvolvimento lento. em cadeia da polimerase são técnicas que atualmente melhoram sua identificação, pois apresentam alta especificidade e sensibilidade ao *Campylobacter fetus*, otimizando a avaliação de populações bovinas com alta densidade. O objetivo da revisão é descrever os métodos atuais para a identificação da doença em bovinos e, assim, poder tomar medidas preventivas e curativas para controlar essa patologia.

**Palavras-chave:** aborto, embrionário, imuno-histoquímica, imunofluorescência, PCR, reabsorção.

### INTRODUCCIÓN

La campylobacteriosis genital bovina (CGB) es una enfermedad bacteriana que causa grandes pérdidas económicas en las producciones ganaderas (Mai et al., 2013; Mai et al., 2012; Mshelia et al., 2010), debido a que ocasiona muerte embrionaria, aborto, infertilidad del hato, reducción en los porcentajes de preñez, aumento en los intervalos entre partos, estros irregulares, disminución en la producción de leche y aumento en costos por tratamientos (Mai et al., 2013; OIE, 2008; Blaser et al., 2008).

La monta directa es uno de los factores de riesgo más importante, el semen de toros sirve como vehículo de muchas enfermedades que alteran las características espermáticas, y el *Campylobacter fetus* (Cf) es un microorganismo que puede sobrevivir después de procesos de criopreservación en semen congelado (Givens & Marley, 2008). En Colombia, la monta directa es la técnica de reproducción más utilizada en la ganadería bovina, donde el 85 % de los terneros

nacidos son hijos de reproductores en las fincas, muchos de estos machos son seleccionados por características fenotípicas y su ganancia de peso, y muchas veces los productores ignoran la realización de pruebas de enfermedades infectocontagiosas y de eficiencia reproductiva (Peña et al., 2011; Giraldo, 2007).

Por lo tanto, diferenciar la CGB de otras enfermedades es de suma importancia, ya que un diagnóstico erróneo resulta en medidas de control y tratamiento inadecuadas (Jiménez et al., 2011; Hancock et al., 2016), debido a que el bajo porcentaje de preñez en vacas es ocasionado por múltiples causas infecciosas y no infecciosas (Graaf-Van et al., 2013; Larson & White, 2016).

Actualmente, se han descrito técnicas moleculares (Agistiana et al., 2018), morfológicas y de aislamiento para el diagnóstico del agente etiológico de la CGB, que permiten la valoración de grandes poblaciones con una alta especificidad y sensibilidad de estas pruebas (Marcellino et al., 2015; Mahajan et al., 2014).

Entre las características moleculares importantes que diferencian al *Campylobacter fetus* *veneralis* (Cfv) del *Campylobacter fetus fetus* (Cff), es que Cfv posee una isla de patogenicidad de 30kb, que corresponden al sistema de secreción bacteriano tipo IV, genes de movilidad y la secuencia de inserción IS transposasa (Abril et al., 2007; Gorkiewicz et al., 2010; Kienesberger et al., 2014; Ali et al., 2012), lo que permite la fabricación de cebadores específicos (Chaban et al., 2012; Graaf-Van et al., 2013; McGoldrick et al., 2013).

Varias técnicas moleculares están disponibles para la identificación *Campylobacter fetus*, como son polimorfismos en la longitud de fragmentos ampliados (AFLP) (Wagenaar et al., 2001), tipificación multifocus de secuencias (MLST) (Van-Bergen et al., 2005), matriz asistida por láser de desorción/ionización tiempo de vuelo (MALDI-TOF) (Bessedé et al., 2011) y reacción en cadena de polimerasa (PCR) (Graaf-Van et al., 2013; Abril et al., 2007), de las cuales PCR es la única fiable para el diagnóstico de las subespecies de Cf, con una sensibilidad del 98 % y una especificidad del 99.8 % (McGoldrick et al., 2013, OIE, 2017; Iraola et al., 2015; Graaf-Van et al., 2013; Mahajan et al., 2014). La presente revisión se realizó con la finalidad de determinar los métodos actuales para la identificación de la CGB.

### Aislamiento de la bacteria

La identificación del organismo mediante medios de cultivo, es una técnica adecuada, ya que se puede determinar las subespecies de Cf (OIE, 2017), las cepas de Cff son menos exigentes que las de Cfv, pero aislarlas muchas veces es difícil, conlleva trabajo y tiempo (Monke et al., 2002; Marcellino et al., 2015; Carter, 1979). Las muestras a cultivar son los placentomas, secreciones prepuciales, mucus cérvico-vaginal y muestras de fetos abortados como contenido abomasal, pulmón e hígado (Michi et al., 2015; OIE, 2017;

Marcellino et al., 2015; Van-Bergen, 2005). La implementación de medios de transporte en muestras de esmegma prepucial y secreciones vaginales, es muy importante para garantizar la presencia de las bacterias, pero se debe tener cuidado en la selección, debido a que muchos de estos contienen Polimixina B y Cicloheximida, moléculas que inhiben el crecimiento de Cf y que están presentes en muchos medios de transporte y cultivos (OIE, 2017; Monke et al., 2002).

El medio de transporte más utilizado es el Cary-blair, en el cual se puede hacer pre-enriquecimiento, para posteriormente realizar el cultivo (Marcellino et al., 2015; Denis et al., 2011; Cipolla et al., 1995), aunque también existen otros como el de Clark, Cander, SBL, Foley y Clark, Weybridge (OIE, 2017; Hum et al., 1994; Monke et al., 2002). Al momento de tomar las muestras mediante hisopado vaginal, lavados uterinos, raspados y lavados prepuciales, se debe garantizar la asepsia (Frey et al., 2017; Manes et al., 2017; Méndez et al., 2014), transportándolas al laboratorio para su procesamiento, en lo posible en un período menor a 2 h, refrigeradas a una temperatura de 4-8 °C y protegidas de la luz solar (OIE, 2017; Marcellino et al., 2015).

Para la selección de un medio de cultivo para Cf, se debe tener en cuenta que no contengan agregados de antibióticos a los que sea sensible la bacteria, como las cefalosporinas u otras moléculas anteriormente mencionadas, que evitan la replicación de este patógeno (Van-Bergen et al., 2005; Monke et al., 2002). Skirrow es el medio más idóneo para su identificación. Este medio de cultivo contiene sangre lisada y desfibrinada al 5-7 %, con 2,5 µL/ml de sulfato de Polimixina B, 5µg/ml de Trimetropin, 10 µg/ml de Vancomicina y 50 µg/ml de Cicloheximida, las cuales son moléculas selectivas, evitando el crecimiento de otros patógenos no deseados (OIE, 2017; Denis et al., 2011; Michi et al., 2015).

Otra alternativa es la realización del pre-enriquecimiento en medio de transporte Cary-Blair, al observarse el crecimiento bacteriano se retira el anillo superficial y se cultiva mediante filtración pasiva en agar ASK y se llevan a incubación a condiciones específicas de la bacteria (Marcellino et al., 2015). Al presentar crecimiento de las colonias, estas se inoculan a un medio no selectivo a base de sangre (OIE, 2017), los cuales pueden ser agar sangre de cordero al 5 % (Michi et al., 2015; Chaban et al., 2012) o agar sangre Columbia, con agregado de sangre bovina al 7 % (Marcellino et al., 2015).

Los requerimientos para condiciones óptimas de incubación son temperatura de 37 °C, y condiciones microaerobias de 5-10 % de oxígeno,

5-10 % de dióxido de carbono y 5-9 % de hidrógeno (Vandame, 2000; Michi et al., 2015).

*Campylobacter fetus* es el agente más aislado en muestras de pulmón y contenido abomasal de fetos abortados bovinos, correspondiendo al 33,4 % de los diagnósticos en Argentina en este tipo de muestras (Fernández et al., 2007). Generalmente, las colonias de *Campylobacter fetus* se observan hasta después de 3-5 días de inoculadas, con un tamaño de 1-3 mm, se caracterizan por ser de un color rosa-grisáceo traslúcidas, de forma redonda convexas como cabeza de alfiler, de aspecto liso brillante y con bordes regulares (Figura 1) (Marcellino et al., 2015; OIE, 2017; García & Legarraga, 2017).

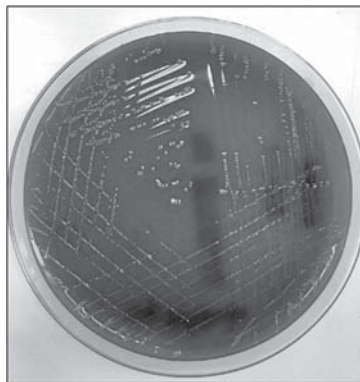


Figura 1. Colonias de *Campylobacter fetus* en agar sangre de cordero 5 %.  
Fuente: García & Legarraga (2017).

### Pruebas bioquímicas para la identificación de Cff y Cfv

Las colonias obtenidas de los medios de cultivo deben ser sometidas a pruebas bioquímicas, las subespecies de *Campylobacter* se caracterizan por ser oxidasa y catalasa positiva (Marcellino et al., 2015; Winn et al., 2008; Denis et al., 2011). Cff, Cfv, junto con otras subespecies difieren en algunas pruebas permitiendo su identificación (Tabla 1) (OIE, 2017; Iraola et al., 2012; Van-Bergen et al., 2005; Salama et al., 1992).

Se ha determinado que Cff tiene crecimiento a 42 °C y es positivo a pruebas de desarrollo en selenito de sodio, cisteína con producción de ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S), cloruro de sodio al 3.5 % y glicina al 1 %, 1.3 % y 1.5 %, mientras que *Campylobacter fetus* *veneralis* no crece en ninguno de los medios mencionados (Tabla 1) (Van-Bergen et al., 2005; OIE, 2017; Winn et al., 2008; Denis et al., 2011; Iraola et al., 2012).

La producción de ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S) se determina al introducir una suspensión de las colonias cultivadas, en un tubo que contiene un medio líquido de agar brucella con 0.02 % de

cisteína, y se considera positivo cuando ocurre reacción en el cambio de coloración de una tira de acetato de plomo, presente en la parte

superior del tubo, la cual se torna de color negro (OIE, 2017; Graaf-Van et al., 2016).

**Tabla 4.** Características bioquímicas que permiten diferenciar las subespecies de *Campylobacter*.

	25 °C	42 °C	Oxidasa	Catalasa	NaCl 3,5 %	Glicina 1 %	H2S cisteína
<i>C. fetus</i> subesp. <i>venerealis</i>	V	-V(a)	+	V	-	-	-
<i>C. fetus</i> subesp. <i>fetus</i>	V	V(a)	+	+	-	+	+
<i>C. jejuni</i>	-	V(b)	+	V(c)	-	V	+
<i>C. hyointestinalis</i>	-	+	+	+	-	V	n.d.
<i>C. sputorum</i>	-	+	+	V	+	+	n.d.

**Nota:** (a) = Aunque *C. fetus* no es una especie termófila de *Campylobacter*, se ha descrito el crecimiento de esta especie a 42 °C; (b) *C. jejuni* subesp. *jejuni* es positivo, *C. jejuni* subesp. *doylei* es negativo; (c) *C. Jejuni* subesp. *jejunii* es positivo, *C. jejuni* subesp. *doylei* es variable; (+) = reacción o crecimiento positivo y (-) = reacción negativa o ausencia de crecimiento de la cepa en un medio adecuado bajo condiciones especificadas; V = resultados variables; n.d. = indeterminado.

Fuente: OIE (2017).

## Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia directa permite identificar la presencia de *Campylobacter fetus* de forma confiable en muestras de mucus cérvico-vaginal, aunque también se pueden realizar en esmegma prepucial y líquido abomasal (OIE, 2017). Marcellino et al. (2015) reportan en su estudio realizado en fluidos vaginales, 5.5 % más hembras positivas a *Campylobacter fetus* con respecto a los medios de cultivo, pero un 40 % menos en toros, debido a que las muestras de fluidos prepuciales deben ser de un alto volumen, con concentraciones mínimas de 100 UFC/ml del agente causal, lo cual dificulta su diagnóstico en los machos mediante esta técnica.

Para el procesamiento de las muestras, se realiza una dilución del lavado uterino u otro fluido en 5 ml de PBS, con formalina al 1 %. Luego, se centrifuga dos veces el sobrenadante a 4 °C, el primero de 10 minutos y el segundo de 30 minutos; posteriormente, colecta dos muestras de 20 µL de este precipitado, y se ponen en portaobjetos y se fijan las placas con etanol a una temperatura de 18-25 °C por un período de tiempo de 30 minutos (OIE, 2017). Finalmente,

se agrega el reactivo de isocianato de fluoresceína isómero (FITC) en un ambiente oscuro, húmedo y con una temperatura de 37 °C durante media hora. Se lavan los portaobjetos tres veces con PBS, en intervalos de un minuto, y se introducen a una solución que está compuesta de 90 % de glicerol y 10 % de PBS,; por último, se colocan los cubreobjetos (OIE, 2017).

Para la observación de las placas, se debe realizar con luz ultravioleta y con placas control negativo y positivo. Las muestras se consideran positivas cuando la morfología es similar a la placa control positiva de *Campylobacter fetus* spp (Marcellino et al., 2015; OIE, 2017; Kienesberger et al., 2007).

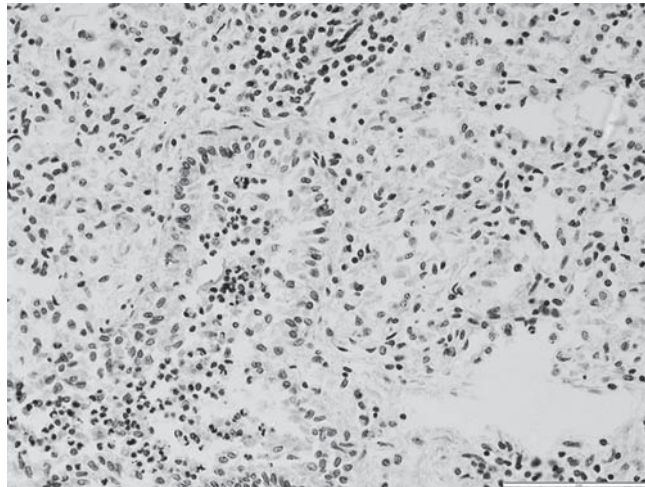
## Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica es un método diagnóstico exitoso en la identificación de *Campylobacter fetus* en órganos de fetos abortados de ovinos y bovinos, con una sensibilidad del 94 % (Campero et al., 2005; Mahajan et al., 2014; Tucuz et al., 2010). La técnica permite una reacción antígeno-anticuerpo-peroxidasa gracias al uso de un anticuerpo monoclonal

específico para *Campylobacter fetus*, que se encuentra comercialmente como ABD serotac (Mahajan 2014; Campero et al., 2005).

La implementación de esta herramienta diagnóstica tiene la ventaja de detectar la

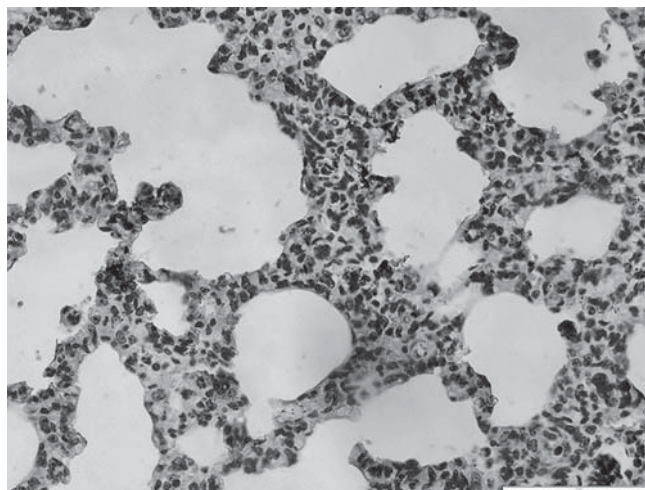
distribución de los antígenos, asociando la respuesta y lesiones microscópicas características de la CGB (Fiorentino et al., 2018; Morell et al., 2011), como la neumonía intersticial y la bronconeumonía neutrofílica (Figura 2) (Mahajan et al., 2014).



**Figura 2.** Bronconeumonía con infiltración de células mixtas (neutrófilos y células linfo-mononucleares) en pulmón de feto abortado positivo a *Campylobacter fetus veneralis* (Hematoxilina y Eosina; 40x).  
Fuente: Mahajan et al. (2014).

Una muestra se considera positiva a la prueba de Inmunohistoquímica cuando se observan áreas de tinción de color marrón oscuro en muestras de pulmón (Figura 3), placenta y/o

tracto gastrointestinal con formas de coma curva, espirales u organismos en S que son característicos de Cf (Campero et al., 2005; Mahajan et al., 2014; Tucuz et al., 2010).



**Figura 3.** Inmunoreacción positiva a anticuerpo monoclonal de *Campylobacter fetus*, con morfología típica de espirales en áreas del pulmón. Inmunohistoquímica 40X.  
Fuente: Mahajan et al. (2014).

## Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR tiene como objetivo la replicación de un fragmento de ADN, mediante la enzima polimerasa obtenida de bacterias termófilas como *Thermus aquaticus*. Cuando se realiza una PCR, se imita la síntesis de ADN de una célula, mediante la adición de la polimerasa, el fragmento genético del patógeno y cebadores (Primers), que se someten a ciclos térmicos para la activación de la enzima y los primers (Cornejo et al., 2014; Iraola et al., 2012; McGoldrick et al., 2013).

Es un método diagnóstico molecular alternativo para la identificación de las subespecies de *Campylobacter fetus* en muestras de fluidos prepuciales, fluidos vaginales, placentas, líquido abomasal y tejidos de fetos abortados (OIE, 2017; Mahajan et al., 2014; Manes et al., 2017).

La técnica consiste en centrifugar durante 15 minutos muestras de contenido estomacal,

fluidos prepuciales o vaginales, tomando 200 µL del sobrenadante obtenido; luego, introduce 20 µL de la muestra en un tubo que contiene la polimerasa, los primers específicos para los genes a amplificar y otras condiciones como de pH de acuerdo con las recomendaciones del kit a utilizar (Mahajan et al., 2014), se lleva al termociclador, el cual realiza una fase de desnaturalización del ADN a temperatura de 95 °C, una fase de recocido a temperatura de 53 °C; y, por último, la fase de extensión a 72 °C (Fiorentino et al., 2017; Cornejo et al., 2014).

Diferentes genes de inserción se han estudiado para las subespecies de Cf, permitiendo la creación de diferentes cebadores implementados en la PCR (Tabla 2). El gen ISCFe1 es el mejor sitio de inserción para la identificación de Cfv con sensibilidad de 97 % y especificidad de 100 % (Abril et al., 2007; Mahajan et al., 2014); así mismo, el gen NahE y la proteína de privación de carbono para Cff con sensibilidad del 100 % y especificidad de 100 % (Graaf-Van et al., 2013).

Tabla 5. Genes de inserción de *Campylobacter fetus fetus* y *Campylobacter fetus veneralis*.

SUBESPECIE	GEN	SENSI	ESPE.	CEBADORES	PESO	FUENTE
<i>Campylobacter fetus veneralis</i>	ISCFe1	97 %	100 %	IVB376-L / IVB376-R	230 pb	Abril et al., 2007
				CVEN-L / CVEN-R2	230 pb	Abril et al., 2007
				C1165g4F / nC1165g4R	233 pb	Fiorentino et al., 2017
	Par A	58 %	83 %	CfvF / CfvR	150 pb	McMillen et al., 2006
				CfvF / CfvR	90 pb	McMillen et al., 2006
NahE	100 %	100 %	VenSF / VenRF	142 pb	Hum et al., 1997	
<i>Campylobacter fetus fetus</i>	SapB2	76 %	72 %	PanCFF / PanCFR	435 pb	Wang et al., 2002
	Proteína de privación de carbono	100 %	100 %	MG3F / MG4R	764 pb	Hum et al., 1997

Nota: SENSI., sensibilidad; ESPE., especificidad.

Fuente: elaboración propia

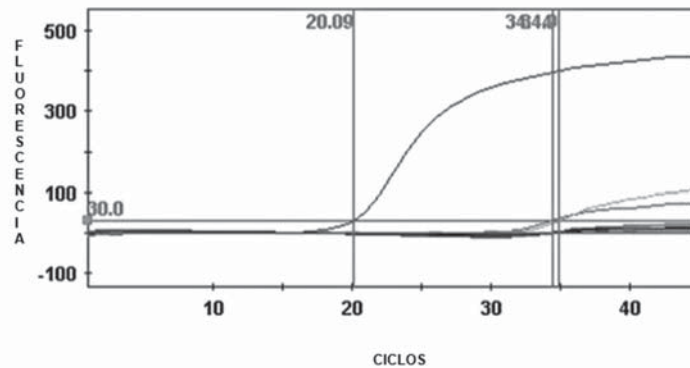
La Multiplex PCR, PCR tradicional y PCR en tiempo real, son las técnicas que permiten la

evaluación de *Campylobacter fetus*, obteniendo buenos resultados (Abril et al., 2007; Fiorentino



et al., 2017; Agistiana et al., 2018). La PCR en tiempo real permite la lectura inmediata de la amplificación de ADN, los termocicladores empleados para esta técnica tiene la capacidad

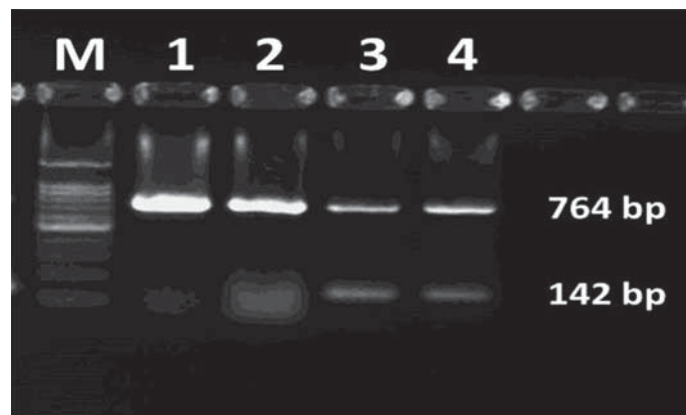
de determinar la replicación de los genes con sustancias fluorescentes mediante tinción con Sybersafe o SYBR Green (Figura 4) (Mahajan et al., 2014).



**Figura 4.** Curva de amplificación *C. fetus subsp. venerealis* usando PCR en tiempo real en tejidos de fetos abortados. Amplificación de las muestras en el ciclo 34 a 38 y del control en el ciclo 20.  
Fuente: Mahajan et al. (2014).

La PCR tradicional y Multiplex PCR la lectura se realiza con electroforesis, permitiendo la visualización del ADN replicado, mediante el accionar de un campo eléctrico que permite la separación de las sustancias proteicas de acuerdo con su peso molecular o paredes de base (pb) (Yábar, 2003).

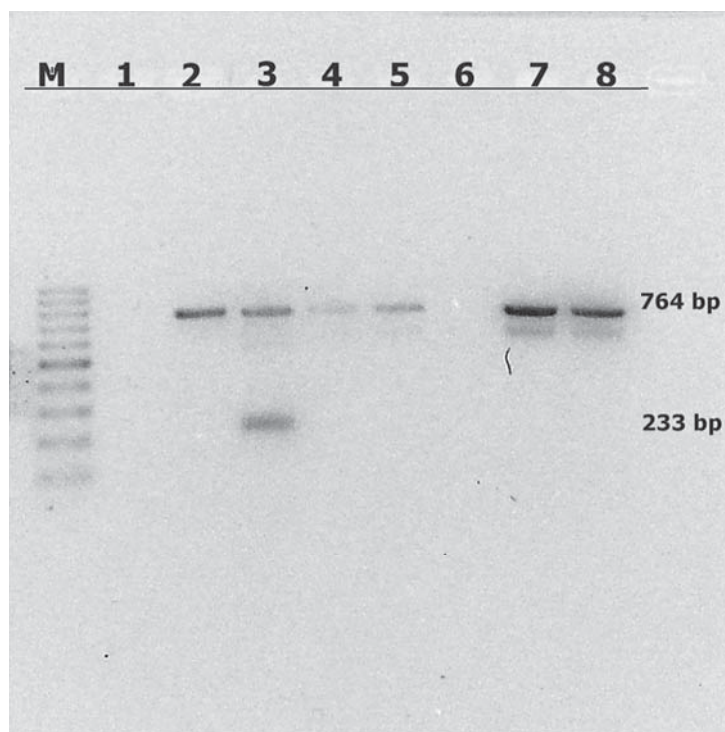
Agistiana et al. (2018) reportan en su estudio, el diagnóstico de las subespecies de *Campylobacter fetus* en lavados prepuciales de toros, implementando la multiplex PCR, con cebadores VenSF/VenSR específicos para Cfv mediante las secuencias 5'-CTT AGC AGT TTG CGA TAT TGC CAT T-3'/5'-GCT TTT GAG ATA ACA ATA AGA GCT T-3', obteniendo un amplicon de 146 pb; y para la identificación de Cff con cebadores MG3F/ MG4R mediante las secuencias 5'-GGT AGC CGC AGC TGC TAA GAT-3'/ 5'-TAG CTA CAA TAA CGA CAA CT-3', obteniendo un amplicon específico de 764 pb (Figura 5).



**Figura 5.** Resultado de identificación con Multiplex PCR en lavados prepuciales de toros. (M) Marcador 100 pb; (1) Cff; (2); Cff; (3) Cfv; (4) Cfv.  
Fuente: Agistiana et al. (2018).

Otro estudio realizado por Fiorentino et al. (2017), reporta un brote de abortos producidos por Cff, el uso de multiplex PCR en tejidos de fetos abortados para el diagnóstico de las subespecies *Campylobacter fetus*. Los primers

utilizados para Cff fueron MG3F/MG4F considerándose positivo un valor de 764 pb. Los primers utilizados para Cfv fueron C1165g4F/nC1165g4R, considerándose positivo un valor de 233 pb (Figura 6).



**Figura 6.** Identificación de *Campylobacter* por Multiplex PCR usando dos conjuntos de cebadores: MG3F / MG4F amplifica una región de 764 pb para Cff, y el conjunto C1165g4F / nC1165g4R amplifica una región de 233 pb que solo está presente en Cfv. M: marcador molecular 100 pb; 1: control negativo; 2: control *Campylobacter fetus fetus*; 3: control *Campylobacter fetus veneralis*; carriles 4-5 pulmones fetales; 6: # 2 placentas; 7: #3 placentas; 8: # 3 placentas.

Fuente: Fiorentino et al. (2017).

## CONCLUSIONES

La inmunofluorescencia y la inmunohistoquímica son técnicas que no identifican las subespecies de *Campylobacter fetus*, ya que su evaluación es mediante la morfología de la bacteria, pero permiten determinar animales positivos o negativos a la CGB, en un menor tiempo y costo que los medios de cultivo. La PCR y los aislamientos son los métodos más sensibles y más específicos para Cff y Cfv. Pero, muchas veces, en los agares *Campylobacter fetus* tiene un desarrollo lento y es difícil garantizar debido a sus altos requerimientos físico químicos; por

lo tanto, la PCR es una alternativa efectiva para el diagnóstico de la CGB, permitiendo evaluar grandes poblaciones de animales sospechosos en poco tiempo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRIL, C., VILEI, E., BRODARD, I., BURNENS, A., FREY, J., Y MISEREZ, R. (2007). Discovery of insertion element ISCfe1: A new tool for *Campylobacter fetus* subspecies differentiation. *Clinical Microbiology and Infection*, 13, 993-1000.

- AGISTIANA, S., SETIYANINGSIH, S., E INDRAWATI, A. (2018). Application of Multiplex PCR Assay for *Campylobacter fetus* Sub sp. Detection and Differentiation in Bovine Preputial Wash. *Buletin Peternakan*, 42(1), 1-7. Doi: 10.21059/buletinpeternak.v42i1.26114.
- ALI, A., SOARES, S., SANTOS, A., GUIMARÃES, L., BARBOSA, et al. (2012). *Campylobacter fetus* subspecies: Comparative genomics and prediction of potential virulence targets. *Gene*, 508, 145-156.
- BESSEDE, E., SOLECKI, O., SIFRE, E., LABADI, L., Y MEGRAUD, F. (2011). Identification of *Campylobacter* species and related organisms by matrix assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *Clinical Microbiology and Infection*, (17), 1735-1739.
- BLASER, M., NEWELL, D., THOMPSON, S., Y ZECHNER, E. (2008). Pathogenesis of *Campylobacter fetus*. En: Nachamkin I., Szymanski C.M., y Blaser M.J. (Eds.), *Campylobacter* (3.<sup>a</sup> ed.) (pp. 401-428). Washington: ASM.
- CAMPERO, C.M., ANDERSON, M.L., WALKER, R.L., BLANCHARD, P.C., BARBANO, L. & CHIU, P. (2005). Immunohistochemical identification of *Campylobacter fetus* in natural cases of bovine and ovine abortions. *J Vet Med.*, 52, 138-141.
- CARTER, G.R. (1979). *Campylobacter* and *Vibrio*. En: Carter, G. (ed.), *Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and micology* (3.<sup>a</sup> ed.) (pp. 53-62). Illinois: Charles C. Thomas Publisher.
- CHABAN, B., CHU, S., HENDRICK, S., WALDNER, C., Y 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.
- CIPOLLA, A.L., CAMPERO, C.M., CANO DE MEDINA, D., MORSELLA, C., COSENTINO, B., Y CARACINO, M. (1995). Un método mejorado para el diagnóstico de la campylobacteriosis genital en vacas. *Revista Argentina de Producción Animal*, 15, 742-5.
- CORNEJO, A., SERRATO, A., RONDÓN, B., Y ROCHA, M. (2014). Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos. México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- DENIS, F., CECILE, M., MARTIN, C., BINGEN, E., Y QUENTIN, R. (2011). *Bactériologie médicale: Techniques usuelles*.
- FERNÁNDEZ, M.E., CAMPERO, C.M., MORRELL, E., CANTÓN, G.J., MOORE, D.P., et al. (2007). Pérdidas reproductivas en bovinos causadas por abortos, muertes prematuras, natimortos y neonatos: casuística del período 2006-2007. Argentina. *Revista de Medicina Veterinaria*, 88, 246-54.
- FIorentino, A., STAZIONATI, M., HECKER, Y., MORSELLA, C., CANTÓN, G., et al. (2017). *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* ovine abortion outbreak in Argentina. *Revista electrónica de Veterinaria*, 18(11).
- FIorentino, M., PAOLICCHI, F., CAMPERO, C., Y BARBEITO, C. (2018). Lectin binding patterns and immunohistochemical antigen detection in placenta and lungs of *Brucella abortus*-bovine infected fetuses. *Open Veterinary Journal*, 8(1), 57-63.
- FREY, C., MÜLLER, N., STÄUBER, N., MARREROSA, N., HOFMANN, L., HENTRICH, B. & HIRSBRUNNER, G. (2017). *Simplicimonas*-like DNA in vaginal swabs

- of cows and heifers cross-reacting in the real-time PCR for *T. fetus*. *Veterinary Parasitology*, 237, 30-36. doi: 10.1016/j.vetpar.2017.02.024
- GARCÍA, V., Y LEGARRAGA, P. (2017). *Campylobacter fetus*. *Revista Chilena de Infectología*, 34(6), 587-588.
- GIRALDO, J. (2007). Una Mirada al uso de la inseminación artificial en bovinos. *Revista Lasallista de investigación*, 4, 51-57.
- GIVENS, D., Y MARLEY, M. (2008). Pathogens that cause infertility of bulls or transmission via semen. *Theriogenology*, 70, 504-507.
- GORKIEWICZ, G., KIENESBERGER, S., SCHOBBER, C., SCHEICHER, S., GULLY, C., ZECHNER, R., Y ZECHNER, E. (2010). A genomic island defines Subspecies-specific virulence features of the host-adapted pathogen *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis*. *Journal of Bacteriology*, 192, 502-517.
- GORKIEWICZ, G., KIENESBERGER, S., SCHOBBER, C., SCHEICHER, S.R., GULLY, C., Y ZECHNER, R. (2010). A genomic island defines subspecies-specific virulence features of the host-adapted pathogen *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. *Journal of Bacteriology*, 192, 502-17.
- GRAAF-VAN, B.L., DUIM, B., MILLER, W., FORBES, K., WAGENAAR, J., Y ZOMER, A. (2016). Whole genome sequence analysis indicates recent diversification of mammal-associated *Campylobacter fetus* and implicates a genetic factor associated with H2S production. *BMC Genomics*, 17, 713.
- GRAAF-VAN, B.L., VAN BERGEN, M.A., VAN DER WAL, F.J., DE BOER, A.G., DUIM, B., Y SCHMIDT, T. (2013). Evaluation of molecular assays for identification *Campylobacter fetus* species and subspecies and development of a *Campylobacter fetus* specific real-time PCR assay. *J Microbiol Methods*, 95, 93-7.
- HANCOCK, A., YOUNIS, P., BEGGS, D., MANSELL, P., STEVENSON, M., Y PYMAN, M. (2016). An assessment of dairy herd bulls in southern Australia: 1. Management practices and bull breeding soundness evaluations. *J Dairy Sci.*, 99, 1-15.
- HUM, S., BRUNNER, J., MCINNES, A., MENDOZA, G., Y STEPHENS, J. (1994). Evaluation of cultural methods and selective media for the isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* from cattle. *Australian Veterinary Journal*, (71), 184-186.
- HUM, S., QUINN, K., BRUNNER, J. & ON, S.L. (1997). Evaluation of a PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. *Australian Veterinary Journal*, (75), 827-831.
- IRAOLA, G., BETANCOR, L., CALLEROS, L., GADEA, P., ALGORTA, G., GALEANO, S., MUXI, P., GREIF, G., Y PÉREZ, R. (2015). A rural worker infected with a bovine-prevalent genotype of *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* supports zoonotic transmission and inconsistency of MLST and whole-genome typing. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, (34), 1593-1596.
- IRAOLA, G., HERNÁNDEZ, M., CALLEROS, L., PAOLICCHI, F., SILVEYRA, S., Y VELILLA, A. (2012). Application of a multiplex PCR assay for *Campylobacter fetus* detection and subspecies differentiation in uncultured samples of aborted bovine fetuses. *Journal of Veterinary Science*, 13, 371-6.
- JIMÉNEZ, D., PÉREZ, A., CARPENTER, T. & MARTÍNEZ, A. (2011). Factors associated with infection by *Campylobacter fetus* in

- beef herds in the Province of Buenos Aires, Argentina. *Argentina*, (101), 157-162.
- KIENESBERGER, S., GORKIEWICZ, G., JOAINIG, M., SCHEICHER, S., LEITNER, E., Y ZECHNER, E. (2007). Development of Experimental Genetic Tools for *Campylobacter fetus*. *American Society for Microbiology. Applied and environmental Microbiology*, 4619-4630.
- KIENESBERGER, S., SPRENGER, H., WOLFGRUBER, S., HALWACHS, B., THALLINGER, G., Y PÉREZ, G.I. (2014). Comparative genome analysis of *Campylobacter fetus* subspecies revealed horizontally acquired genetic elements important for virulence and niche specificity. *Plos One*, 9(1). doi: 10.1371/journal.pone.0085491
- LARSON, R., Y WHITE, B. (2016). Evaluating Information Obtained from Diagnosis of Pregnancy Status of Beef Herds.
- MAHAJAN, V., HARMANJIT, B., Y ANIL, G. (2014). Immunohistochemical and Molecular Approaches for the Diagnosis of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* in Natural Cases of Bovine Abortion. *The National Academy of Sciences*, 85(2). Doi: 10.1007/s40011-014-0369-9.
- MAI, H., IRONS, P., KABIR, J., Y THOMPSON, P. (2012). A large seroprevalence survey of brucellosis in cattle herds under diverse production systems in Northern Nigeria. *BMC Vet. Res.*, 8(144).
- MAI, H., IRONS, P., KABIR, J., Y THOMPSON, P. (2013). Herd-level risk factors for *Campylobacter fetus* infection, *Brucella* seropositivity and within-herd seroprevalence of brucellosis in cattle in northern Nigeria. *Prev Vet Med.*, 111(3-4), 256-67. doi: 10.1016/j.prevetmed.2013.05.016
- MANES, J., FIORENTINO, M., SAN MARTINO, S., Y UNGERFELD, R. (2017). Changes in the vaginal microbiota in ewes after insertion of intravaginal sponges at different stages of the oestrous cycle. *Livestock Science*, 208, 55-59. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2017.11.023>.
- MARCELLINO, R., MORSELLAB, C., CANOB, D., Y PAOLICCHIB, F. (2015). Eficiencia del cultivo bacteriológico y de la inmunofluorescencia en la detección de *Campylobacter fetus* en fluidos genitales bovinos. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(3), 183-189.
- MCGOLDRICK, A., CHANTER, J., GALE, S., PARR, J., TOSZEGHY, M., Y LINE, K. (2013). Real Time PCR to detect and differentiate *Campylobacter fetus* subspecies *fetus* and *Campylobacter fetus* Subspecies *venerealis*. *Journal of Microbiology Methods*, 94, 199-204.
- MCMILLEN, L., FORDYCE, G., DOOGAN, V.J., Y LEW, A.E. (2006). Comparison of culture and a novel 5' Taq nuclease assay for direct detection of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* in clinical specimens from cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 938-945.
- Méndez, D., Góngora, A., y Gómez, L. (2014). Aislamiento e identificación de la flora bacteriana uterina en vacas donantes de embriones. *Orinoquia*, 18(1), 86-91.
- Michi, A., Favetto, P., Kastelic, J., y Cobo, E. (2015). A review of sexually transmitted bovine trichomoniasis and campylobacteriosis affecting cattle reproductive health. *Theriogenology*, 85(5), 781-791. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.10.037.
- Monke, H.J., Love, B.C., Wittum, T.E., Monke, D.R., y Byrum, B.A. (2002). Effect of transport enrichment medium, transport time, and growth medium on the detection of *Campylobacter*

- fetus subsp. venerealis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 14, 35-9.
- Morrell, E.L., Barbeito, C.G., Odeón, C.A., Gimeno, E.J. & Campero, C.M. (2011). Histopathological, immunohistochemical, lectin histochemical and molecular findings in spontaneous bovine abortions by *Campylobacter fetus*. *Reprod Domest Anim.*, 46, 309-315.
- Mshelia, G., Amin, J., Egwu, G., Yavari, C., Murray, R., y Woldehiwet, Z. (2010). Detection of antibodies specific to *Campylobacter fetus* subsp. venerealis in the vaginal mucus of Nigerian breeding cows. *Veterinaria Italiana*, 46, 337-344.
- OIE. (2017). Manual terrestre OIE 2017: Campylobacteriosis genital bovina. Recuperado de [http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/2.04.04\\_Campilobact\\_bovina.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.04.04_Campilobact_bovina.pdf). Consultado en: 15/05/18.
- OIE. (2008). Bovine genital campylobacteriosis and Trichomonosis. World Organization for Animal Health. Recuperado de [http://www.oie.int/wahis/public.php?page=disease\\_timelines](http://www.oie.int/wahis/public.php?page=disease_timelines).
- PEÑA, M., GÓNGORA, A., Y JIMÉNEZ, C. (2011). Infectious agents affecting fertility of bulls, and transmission risk through semen. Retrospective analysis of their sanitary status in Colombia. *Colombia. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 24, 634-646.
- SALAMA, S.M., GARCÍA, M.M., Y TAYLOR, D.E. (1992). Differentiation of the subspecies of *Campylobacter fetus* by genomic sizing. *Int. J. Syst. Bact.*, (42), 446-450.
- TUCUZ, M., ORUC, E., TUCUZ, N., YOLDAS A., Y YIGIN, A. (2010). Diagnosis of Campylobacteriosis in the aborted bovine fetuses by pathological, immunohistochemical, microbiological and real time PCR. *Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, Kafkas University*, 16, 509-514.
- VAN BERGEN, M., DINGLE, K.E., MAIDEN, M.C., NEWELL, D.G., GRAFF-VAN B.L., VAN PUTTEN, J.P., Y WAGENAAR, J.A. (2005). Clonal nature of *Campylobacter fetus* as defined by multilocus sequence typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 5888-5898.
- VANDAMME, P. (2000). Taxonomy of the family Campylobacteraceae. In: Nachamking N. y Blaser M.J. (Eds.), *Campylobacter*. (2.ª ed.) (pp. 3-20). Washington: American Society for Microbiology.
- WAGENAAR, J.A., VAN BERGEN, M.A., NEWELL, D.G., GROGONO-THOMAS, R., Y DUIM, B. (2001). Comparative study using amplified fragment length polymorphism fingerprinting and phenotyping to differentiate *Campylobacter fetus* strains isolated from animals. *Journal of Clinical Microbiology*, (39), 2283-2286.
- WANG, G., CLARK, C.G., TAYLOR, T.M., PUCKNELL, C., BARTON, C., PRICE, L., WOODWARD, D.L., Y RODGERS, F.G. (2002). Colony multiplex PCR assay for the identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. fetus. *J. Journal of Clinical Microbiology*, 40, 4744-4747.
- WINN, W., ALLEN, S., JANDA, W, KONEMAN, E., PROCOP, G., SCHRECKENBERGER, P., Y WOODS, G. (2008). Diagnóstico microbiológico: bacilos gramnegativos curvos y fermentadores de oxidasa positivos (6.ª ed.). España: Panamericana.
- YÁBAR, C. (2003). Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN. Perú: Instituto Nacional de Salud.