



CAMPYLOBACTERIOSIS GENITAL BOVINA: Importancia del monitoreo previo al entore

L. Moreno¹; S. Pimentel¹; A. Mederos¹; B. Carracelas¹;
D. Galarraga²; F. López³; R. Bove³

¹Programa Nacional de Producción de Carne y Lana;
²Ejercicio Liberal; ³DILAVE, "M.C. Rubino", Regional Norte

INTRODUCCION

La Campylobacteriosis genital bovina (CGB), previamente denominada vibriosis, es una enfermedad venérea que afecta a bovinos tanto lecheros como para carne. El agente que la causa es una bacteria denominada *Campylobacter fetus* subespecie *venerealis*.

Campylobacter fetus se divide en dos subespecies estrechamente relacionadas entre sí: *C. fetus* subespecie *venerealis* (*C.f. venerealis*) y *C. fetus* subespecie *fetus* (*C.f. fetus*). A su vez, se ha descrito un biotipo intermedio de la subespecie *venerealis*. La diferenciación de dichas subespecies es sumamente importante puesto que poseen asociaciones patogénicas diferentes.

Campylobacter f. fetus se encuentra generalmente en el tracto intestinal de bovinos y ovinos y puede causar abortos en forma esporádica en dichas especies. También se lo ha asociado como causante muy raro de enteritis, aborto, endocarditis y meningitis en humanos. *C.f. venerealis* parece estar muy adaptado al tracto genital de bovinos y no sobrevive en el intestino.

La principal manifestación clínica de la CGB es infertilidad, repetición de celos y ocasionales abortos.

El toro es portador sano de la enfermedad, esto quiere decir que es transmisor de la misma, aunque su capacidad reproductiva no está afectada. El *C. f. venerealis* se aloja en las criptas prepuciales del toro.

Estas criptas prepuciales aumentan en número y medida con la edad del toro, por lo cual, toros más viejos tienen un rol importante en la transmisión de la enfermedad. Esto no quiere decir que los toritos jóvenes son libres de la enfermedad, pues cuando conviven con toros adultos, la misma puede transmitirse por el hábito de monta (sodomía) que poseen los mismos.

En la hembra, la enfermedad se manifiesta por ciclos estrales largos, repeticiones de celos, bajos porcentajes de preñez debido a mortalidad embrionaria y abortos que no suelen ser mayores del 10%.

Entre otros, los potenciales factores de riesgo de introducción y diseminación de la enfermedad son el intercambio de toros entre productores; alambrados en mal estado; presencia de toros saltadores; compra de hembras vacías o de descarte, etc.

IMPORTANCIA DE LA ENFERMEDAD EN URUGUAY

En nuestro país, los índices de procreo son considerados bajos y según datos proporcionados por DIEA durante 2012, el promedio de procreos en el período 1981 a 2012 fue de 63% (rango: 50%-75%). Aunque esto, en general, ha sido atribuido principalmente a aspectos nutricionales y de manejo, no se puede descartar el potencial efecto de diversas enfermedades que afectan a la reproducción y sobre todo a las de transmisión venérea, que están presentes en los rodeos de cría de nuestro país.

Un estudio realizado en Uruguay al comienzo del año 2000 por DILAVE-INIA reveló la presencia CGB en un 37% de los establecimientos evaluados y en un 28% de los toros muestreados.

Luego de este relevamiento, no hemos identificado nuevos estudios epidemiológicos publicados en la literatura en nuestro país. Sin embargo, a modo de ejemplo, durante el presente año 2014 y con motivo del XII Taller de "Evaluación de diagnósticos de preñez del ganado bovino" realizado en INIA Treinta y Tres en el mes de julio, se menciona como principal enfermedad causante de problemas de fertilidad a la CGB, por lo cual se presume que la misma es endémica en nuestros rodeos de cría.

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

El diagnóstico se realiza en los toros, en las hembras y en fetos abortados.

En el toro, el diagnóstico de CGB se realiza mediante raspados prepuciales en el período de reposo sexual de los mismos. Debido a las características del agente causante, se recomienda preferentemente la realización de tres raspajes con intervalos de al menos 10 días, por lo cual se debe comenzar unos 60 días antes del entore, de manera de permitir un tiempo suficiente para realizar medidas preventivas o de control pertinentes para cada caso.



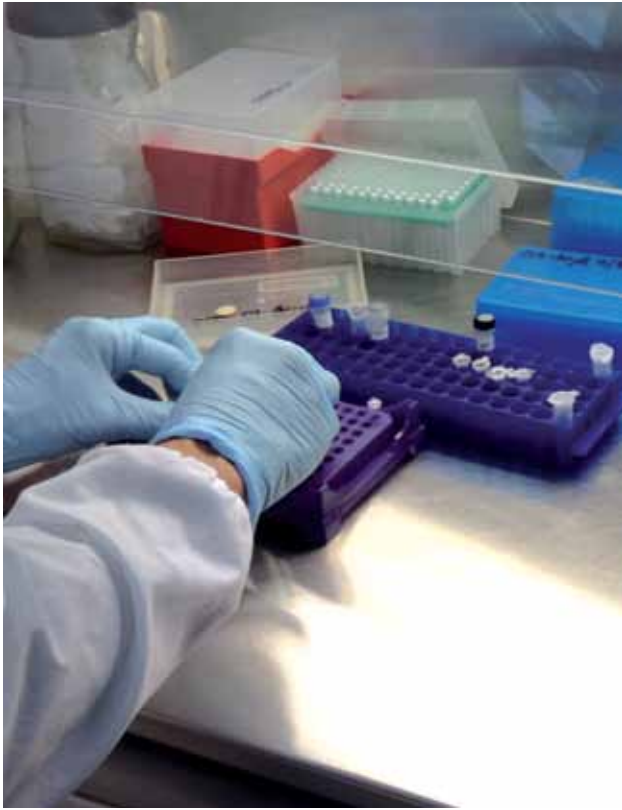
En las hembras, el material de elección para el diagnóstico es el mucus vaginal o descargas uterinas de animales abortados, pudiendo utilizarse para su extracción la pipeta de inseminación artificial. En el caso de fetos, es importante recoger los mismos y enviarlos en forma refrigerada al laboratorio para su análisis, con el objetivo de aportar información en las potenciales causales de abortos.

Técnicas de laboratorio

Existen varias técnicas de diagnóstico, las cuales se utilizan tanto en serie o paralelo para proporcionar un diagnóstico lo más preciso posible.

Las técnicas de diagnóstico de CGB fenotípicas más utilizadas son la inmuno-fluorescencia directa (IFD) y el aislamiento bacteriológico. La técnica de IFD identifica la especie *C. fetus* y el aislamiento mediante cultivos permite la posterior diferenciación a nivel de subespecies. El *C.f. venerealis* es de lento crecimiento, por lo cual el aislamiento de este microorganismo es complejo y costoso.

La clasificación de subespecies *C.f.fetus* o *C.f.venerealis* se ha hecho tradicionalmente mediante pruebas bioquímicas, fundamentalmente en la tolerancia (*C.f.fetus*) o intolerancia (*C.f.venerealis*) a la glicina. En los últimos años y con el advenimiento de nuevos métodos moleculares, se ha demostrado que las clasificaciones fenotípicas son poco reproducibles ya que las cepas intermedias descritas de la subespecie *venerealis*, son también



tolerantes a la glicina. Los métodos moleculares para la diferenciación de subespecies de *C. fetus*, si bien han demostrado ser muy eficientes, son muy laboriosos y requieren de equipamiento costoso y conocimientos de expertos.

La opción más apropiada para el diagnóstico parecen ser entonces los métodos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y el PCR a tiempo real.

La mayoría de los test convencionales de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han sido exitosos en la tipificación de la especie *C.f. venerealis*, pero pocos de ellos han sido exitosos en la identificación de *C.f. venerealis* a partir de muestras directas de campo. Por lo cual la optimización de los procedimientos de muestreo es uno de objetivos deseados en una metodología eficaz de diagnóstico.

Un trabajo publicado por van der Graaf y col. (2013), realizó comparación de los protocolos de PCR y PCR tiempo real descritos en la literatura utilizando un número importante de cepas de *Campylobacter* spp. Este trabajo reveló que el protocolo de PCR descrito por Abril y col. (2007) posee un 100% de sensibilidad¹ y especificidad² para la especie *C. fetus*. Sin embargo, cuando se trata de identificar subespecies, los resultados de los protocolos evaluados no fueron coincidentes.

A partir de ahí, los autores desarrollaron diferentes protocolos para PCR a tiempo real, dos de los cuales apuntan a diagnosticar *C.f. venerealis* cuyas sensibilidades y especificidades varían entre 97% y 100%. Aunque no perfectos, estos resultados son considerados muy buenos para técnicas de diagnóstico. Por otra parte, dependiendo de la situación epidemiológica, las pruebas pueden ser utilizadas tanto en paralelo como en serie para mejorar sensibilidad o especificidad.

RESULTADOS PRELIMINARES DE INVESTIGACIÓN EN INIA TACUAREMBÓ-DILAVE REGIONAL NORTE

INIA Tacuarembó en conjunto con DILAVE Regional Norte, está realizando trabajos con el objetivo de estudiar diferentes pruebas de diagnóstico y conocer el comportamiento de cada una de ellas, para luego estudiar métodos de control de esta enfermedad.

El tema ha sido encarado mediante dos metodologías:

1 - Realización de una revisión sistemática de trabajos publicados en la literatura para evaluar críticamente y analizar los resultados de los estudios, en forma objetiva. Estos resultados identificaron 25 estudios que involucran técnicas de diagnóstico para CGB. De ellos, solamente dos trabajos estudiaron y presentaron información sobre la sensibilidad (88%) y especificidad (92%) de IFD en raspados prepuciales contaminados con cepas conocidas. En cuanto a las técnicas moleculares, ninguno de los estudios identificados como pertinentes menciona sensibilidad y especificidad cuando se usan, como matrices, muestras de raspados prepuciales.

2 - Al mismo tiempo, se ha estado trabajando en la puesta a punto y validación de varios protocolos de PCR y PCR a tiempo real, con muestras de campo, pues el comportamiento de los mismos cambia de acuerdo a situación epidemiológica, condiciones del laboratorio, etc.

Para ello se comenzó adaptando protocolos de toma de la muestra y transporte al laboratorio, poniendo a punto las técnicas fenotípicas de IFD y cultivos bacteriológicos y por último, poniendo a punto técnicas moleculares de PCR.

Finalmente, se dispone de un protocolo diseñado por el laboratorio para PCR convencional múltiple (*C.fetus* y *C.f. venerealis*) y PCR a tiempo real para *C.f. venerealis*. Para PCR tiempo real, se ha estado trabajando con un kit comercial de PrimerDesign y desde el año 2013, con los protocolos descritos por van der Graaf y col. (2013), los cuales poseen una sensibilidad y especificidad conocida utilizando un número importante de cepas, pero no se conoce su comportamiento con muestras de campo.

¹ definida como habilidad de una prueba diagnóstica de dar un resultado positivo dado que el agente/condición esté presente

² definida como la habilidad de la prueba diagnóstica de dar un resultado negativo dado que el agente/condición no esté presente

Algunos resultados preliminares

Las pruebas de IFD y cultivos bacteriológicos fueron procesadas en el laboratorio DILAVE Regional Norte y las moleculares en INIA Tacuarembó.

Todos los protocolos presentaron 100% de sensibilidad y especificidad con las mencionadas cepas. La validación y estudio del comportamiento de las mismas con muestras de campo es motivo de una tesis de maestría.

En el Cuadro 1 se presentan algunos resultados preliminares obtenidos de muestreos de toros en diferentes establecimientos, los cuales han sido procesados por diferentes pruebas diagnósticas durante el año 2013. En el mismo se presenta el número de animales positivos a IFD (*C.fetus*) y a cualquiera de los PCR, tanto convencional como de tiempo real para identificación de *C.f. venerealis*. Los resultados muestran que las pruebas de PCR fueron capaces de detectar mayor número de toros positivos que la IFD.

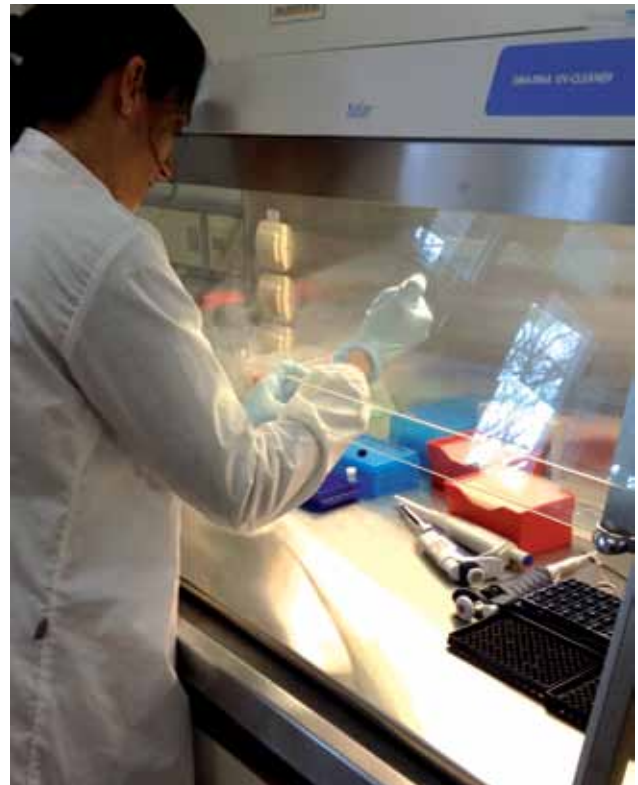
Los resultados preliminares obtenidos durante el año 2013 mostraron que de un total de 104 toros analizados, 49 (47,1%) fueron positivos a *C.f. venerealis* utilizando PCR. Cuando se interpretan los resultados teniendo en cuenta las dos pruebas, casi un 53% de los animales resultan positivos a *C. fetus*.

CONTROL Y PREVENCIÓN DE LA CAMPYLOBACTERIOSIS GENITAL BOVINA

El control de la CGB tiene como objetivo romper el ciclo de transmisión y eso es posible mediante la adopción de medidas de manejo tales como (Campero, 2011):

1 - Realización de inseminación artificial en rodeos problema, al menos en el grupo de vaquillonas.

2 - Muestreo de los toros y análisis negativos, preferentemente en tres raspados prepuciales, con la frecuencia de 10-15 días entre los mismos.



3 - Vacunación contra CGB, dos dosis previo al servicio en rodeos sin inmunidad y repetir anualmente.

4. Revisación y muestreo sistemático a todo toro que ingrese al rodeo de cría.

5 - No rotar los toros entre diferentes grupos durante el entore.

Dependiendo del sistema de producción, otras medidas complementarias para implantar son evitar los toros saltadores de alambrados; venta para faena de hembras vacías al diagnóstico de gestación; hembras repetidoras de celo o sin ternero.

Cuadro 1 - Resultados del número y frecuencias (entre paréntesis) de toros positivos a IFD y PCR procesados durante el período julio 2013-julio 2014.

PRUEBA	N° TOROS POSITIVOS (n=104)
IFD ¹	36 (34,6%)
PCR ²	49 (47,1%)
TOTAL POSITIVOS (cualquier prueba)	55 (52,9%)

¹ IFD=Inmuno fluorescencia directa la cual identifica especie *Campylobacter fetus*

² PCR= Reacción en cadena de la polimerasa tanto convencional como a tiempo real

El tratamiento de los toros con antibióticos está descrito, aunque luego de finalizado el mismo se debe volver a realizar los raspados prepuciales (de ser viable se recomienda aumentar el número de muestreos a cuatro antes de dar un resultado negativo) y aquellos toros que no responden, deben ser eliminados con destino a faena.

CONSIDERACIONES FINALES

El objetivo de este artículo es, por un lado destacar la importancia de un problema que puede estar pasando desapercibido en los rodeos de cría y, por otro lado, poner de manifiesto la alta presencia de *C. fetus venerea* en la muestra estudiada.

De los materiales procesados hasta el momento, se puede concluir que la presencia de CGB en los rodeos de cría es alta; estos datos son coincidentes con la información recientemente difundida con motivo del XII Taller "Evaluación de diagnósticos de preñez del ganado bovino" realizado en INIA Treinta y Tres, donde se menciona un 43% de diagnósticos a CGB en DILAVE "M.C. Rubino Central" y un 10% en un laboratorio privado. Esto afirmaría la sospecha de que esta enfermedad estaría contribuyendo a los bajos índices de procreo de los rodeos de cría a nivel nacional. Muchos de los toros positivos a *C.f. venerealis* por PCR y PCR a tiempo real, fueron negativos a las pruebas fenotípicas y debieron ser confirmados por secuenciación de los segmentos amplificados.



Esto se ve corroborado en los resultados presentados en el Cuadro 1, donde se obtuvieron mayor número de positivos a PCR que a IFD.

Otro hecho significativo es que muchos toros positivos son toros vírgenes, por lo cual se debería extremar los cuidados en el manejo de esta categoría.

En resumen, la CGB es una enfermedad que está presente en los rodeos de cría de nuestro país y se deben tomar las medidas necesarias para conocer su situación en los establecimientos y ser cuidadosos con los animales nuevos que vayan a ser introducidos. Por lo tanto, antes de la época de servicio, es importante planificar con tiempo la revisión de los toros (por ser los portadores sin síntomas) e incluir el raspado prepucial de los mismos. En consulta con el Médico Veterinario del establecimiento se deben implementar los programas de prevención y/o control correspondientes.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a los productores y Médicos Veterinarios por su participación en los muestreos. A los Dres. Carlos Campero y Marcelo Fort de INTA Balcarce y La Pampa por su desinteresada colaboración y entrenamiento en técnicas de diagnóstico. Al Dr. Julián Bermúdez por su colaboración en diagnóstico microbiológico. A INIA por la financiación del proyecto y particularmente al Ing. Agr. (PhD) Fabio Montossi por su apoyo en la investigación realizada.

REFERENCIAS CONSULTADAS

Campero, C., 2011. Las enfermedades de transmisión sexual en los bovinos: Su persistencia en los sistemas de cría. INIA Tacuarembó 655, 4-5.

Harwood, L.J., Thomann, A., Brodard, I., Makaya, P.V., Perreten, V., 2009. *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* transport medium for enrichment and PCR. *Vet. Record*, 165, 507-508.

Hum S, Quinn K, Brunner J, On SL. (1997). Evaluation of a PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. *Aust Vet J* 75:827-831.

OIE (2008) Manual de la OIE sobre animales terrestres. Capítulo 2.4.5. *Campylobacteriosis genital bovina*.

http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.04.05_Campilobact_bovina.pdf. Última visita: julio de 2013.

Repiso M V, Gil A, Bañales P, D'Anatro N, Fernández L, Guarino H, Herrera B, Núñez A, Olivera M, Takeshi O, Silva M. (2005). Prevalencia de las principales enfermedades infecciosas que afectan el comportamiento reproductivo en la ganadería de carne y caracterización de los establecimientos de cría del Uruguay. INIA. Serie FPTA N° 13.

Wagenaar JA, van Bergen MA, Newell DG, Grogono-Thomas R, Duim B. (2001). Comparative study using amplified fragment length polymorphism fingerprinting, PCR genotyping, and phenotyping to differentiate *Campylobacter fetus* strains isolated from animals. *J Clin Microbiol* 39:2283-2286.

van der Graaf-van Bloois, L., van Bergen, M.A.P, van der Wal, F.J., de Boer, Duim, B., Schmidt, T., Wagenaar, J.A., 2013. Evaluation of molecular assays for identification *Campylobacter fetus* species and subspecies and development of a *C.fetus* specific real-time PCR assay. *Jour. Microbiol.Met.*, 95, 93-97.