

# INFECCIÓN PERSISTENTE DE CAMPYLOBACTER FETUS FETUS EN HEMBRA BOVINA PREÑADA

Catena, María (1); Soto, P.(1); Monteavaro, C.(1); Echevarría, H. (1) y Racciatti, M.(2).

1) Dpto. de Sanidad Animal y Medicina Preventiva Fac Cs. Vet. U.N.C.P.B.A

2) Actividad privada.

[www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar)

Volver a: [Enfermedades de la reproducción](#)

## RESUMEN

Durante un ensayo de vacunación contra campilobacteriosis genital bovina en un establecimiento de tambo de la Pcia. de Buenos Aires, en una hembra de tres años de raza Holando Argentino con una preñez de 4 meses, se detecta en el área cervico-vaginal la presencia de *Campylobacter fetus*.

De dicho animal se efectuaron muestreos seriados de mucus cérvico-vaginal (MCV) para determinar la persistencia de la infección, mediante inmunofluorescencia directa (IFD), cultivo en medios selectivos y posterior tipificación bioquímica. La respuesta inmune fue medida a través de los sueros y MCV obtenidos en los diferentes muestreos, mediante Enzima-inmunoensayo e Inmunofluorescencia indirecta (IFI). Posteriormente, por Western blotting se realizó el reconocimiento de bandas.

Las cepas aisladas en los diferentes muestreos fueron identificadas bioquímicamente como *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*. En el Western blotting no se observó el reconocimiento de la mayoría de las bandas y las titulaciones de inmunoglobulinas séricas y en MCV presentaron títulos negativos o muy bajos.

Los datos obtenidos demuestran la persistencia de la infección vaginal con *Campylobacter fetus fetus* durante la gestación, con escasa o nula respuesta inmune a nivel sistémico y del tracto reproductivo.

Palabras claves: *infección persistente, Campylobacter fetus fetus, preñez, bovino vacunado*

## INTRODUCCIÓN

La campilobacteriosis genital bovina (CGB) es una enfermedad infecciosa venérea, causada por *Campylobacter fetus fetus* (C.f.f.) y *Campylobacter fetus venerealis* (C.f.v.) que se caracteriza por producir mortalidad embrionaria y abortos esporádicos, con pérdidas económicas que van en detrimento del desarrollo en los sistemas de producción de nuestra ganadería. (Bryner et al, 1971), considerando que un 10% de las pérdidas durante la gestación temprana corresponden a enfermedades infecciosas. La hembra se infecta durante el servicio, mediante el cual, el *Campylobacter fetus* (C.f.) es depositado en vagina en forma conjunta con el semen pudiendo quedar acantonado en el área cérvico-vaginal o colonizar útero provocando mortalidad embrionaria o aborto.

La presencia de la enfermedad durante varios ciclos reproductivos, puede ser atribuible a que no sean detectados la totalidad de los animales enfermos, ya sea, por fallas en el diagnóstico, en las medidas de manejo, profilaxis, o a la presencia de hembras portadoras dentro del rodeo. Estas hembras no siempre son detectadas y tienen importancia epidemiológica por estar persistentemente infectadas y ser transmisoras de la enfermedad de un período reproductivo a otro pudiendo presentar fallas reproductivas o no, con presencia de la bacteria en el área cérvico-vaginal.

Dicha persistencia puede ser de hasta 14 meses (Corbeil, L. 1975, Blaser, M.1993) coincidiendo con variaciones antigénicas de la superficie bacteriana de C.f. asociadas a proteínas de alto peso molecular (S-Layer), las cuales están relacionadas con la virulencia de la bacteria y la resistencia de las cepas a la fagocitosis. (Blaser, M.; 1993). Cepas de C.f. con iguales patrones de restricción de bandas, difieren su comportamiento cuando son enfrentadas con sueros específicos, con un pequeño rango de antígenos expresados que son reconocidos por el huésped y de esta manera, permitiendo su persistencia en el tracto reproductivo (Lisle, G. 1987). La respuesta inmune sistémica en animales vacunados demuestra altos niveles de IgG, estando también presente en secreciones uterinas y vaginales con predominio de la IgA, con prevención en infecciones posteriores y algunos casos la cura de animales con infección crónica. (Corbeil, L., 1974, 1999).

En este trabajo, se presenta un caso particular de infección persistente a *Campylobacter fetus fetus* en el área cérvico-vaginal de una hembra preñada desde a los 4 meses de gestación hasta el momento del parto. Las cepas aisladas durante la infección presentaron variaciones antigénicas asociadas a proteínas de diferente peso molecular no siendo reconocidas por los anticuerpos a nivel local y sistémico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Rodeo:

Se tomaron muestras de una hembra Holando Argentino con 4 meses de gestación hasta el momento del parto, proveniente de un establecimiento de tambo del partido de Tandil, Pcia. de Bs. As, con antecedentes de la enfermedad, en el cual se realizó un ensayo de vacunación para medir la respuesta inmune sérica y local, utilizando una bacterina comercial a *Campylobacter fetus* con las dos subespecies, en dos dosis, siendo inoculada la última dosis 15 días previos al servicio.

Las muestras consistieron en mucus cérvico-vaginal (MCV) extraídas mediante la jeringa de Cassou y vainas azules y sangre para la extracción de suero, con intervalos de aproximadamente 30 días durante 6 meses.

### Identificación bacteriana:

Los MCV se procesaron por IFD y fueron sembrados en medio Skirrow con sangre equina hemolizada y mezcla antibiótica de rutina para el aislamiento de *Campylobacter*. (Terzolo, H y col.,1993). Las placas se incubaron hasta 10 días a 37° C, con una atmósfera de 85% de N<sub>2</sub>, 10% de CO<sub>2</sub>, y 5% de O<sub>2</sub>.

Las bacterias aisladas posteriormente se tipificaron bioquímicamente, realizando las siguientes pruebas: catalasa, oxidasa, producción de H<sub>2</sub>S en medios sensibilizados con 0,002% de cisteína, utilizando para la detección tiras de papel embebidas en acetato de plomo, crecimiento en glicina 1%, ClNa 4% y desarrollo a 42° C. (On, S, 1996; Vandamme, P et al, 2005)

### Obtención de extracto bacteriano para electroforesis en gel de poliacrilamida:

Las células bacterianas fueron colectadas con 0.01 M de buffer fosfato pH 7 y lavadas 3 veces por centrifugación. La concentración de los pellet bacteriano se ajustó a 3,5 mg/ml de proteína (Brooks,B. et al, 1996).

### Electroforesis:

Las preparaciones bacterianas para SDS-PAGE se procesaron según la metodología de Laemmli (1970). Diez microlitros de cada muestra ajustadas por densidad óptica, fueron separadas en geles de poliacrilamida al 10% utilizando una cuba de electroforesis vertical (Hofer, USA).

### Western blotting:

Se transfirieron las bandas proteicas obtenidas a papel de nitrocelulosa mediante la aplicación del método de Towbin y col (1979) utilizando un equipo de transferencia electroforética horizontal (Nova Blot Pharmacia).

Para el reconocimiento de las diferentes bandas se usaron los sueros puros y en diluciones 1/10 correspondientes a los diferentes muestreos y como segundo anticuerpo una antigammaglobulina bovina marcada con peroxidasa (Sigma A-7414). Se utilizó como control un suero bovino proveniente de una vaquillona infectada experimentalmente, el cual fue titulado por IFI y microaglutinación en 1/800.

### Determinación de patrones de bandas:

Se efectuó con un densitómetro de barrido utilizando para su lectura un software adecuado (Hoeffler GS 300). Para determinar los patrones de banda se utilizó una mezcla de estándares de peso molecular conocido.

### Inmunofluorescencia indirecta:

Se utilizaron portaobjetos adecuados para I.F. conteniendo doce áreas marcadas de 6 mm. En cada área se fijó mediante acetona C.f.f. en concentraciones constantes, posteriormente se enfrentaron con diluciones seriadas 1/ 10 de los sueros y MCV. Como segundo anticuerpo se utilizó una antigamaglobulina bovina realizada en conejo, utilizando para su detección una IgG anticonejo marcada con isotiocianato de fluoresceína (Sigma, F-0382). En cada portaobjetos se utilizaron controles positivos con los sueros mencionados anteriormente y como negativos sueros de terneros.

### Enzaimunoensayo

Un pool de las cepas obtenidas en los diferentes muestreos fue cultivado según lo descrito anteriormente. La suspensión obtenida de las placas fue lavada 3 veces con PBSS pH 7 a 4° C a 8000 rpm. El pellets del lavado de las placas, fue resuspendido en buffer carbonato (0.05 M pH 9.6) para ser ajustada su concentración por D.O. Se sembraron 100 ml de antígeno por pocillo en placas de 96 pocillos (inter Med NUNC).

Se utiliza como primer anticuerpo diluciones seriadas de 1/10 del MCV y suero de los diferentes muestreos. Las muestras se colocan por triplicado, con controles positivos de título conocido y controles negativos. Como segundo anticuerpo una antigamaglobulina bovina realizada en conejo marcada con peroxidasa. El revelado se efectúa con ABTS (SIGMA A 4798)

La D.O. se determinó con Titertek Multiscan a 450 nm. Los resultados fueron expresados en D.O. de acuerdo a las diluciones séricas o de MCV.

## RESULTADOS

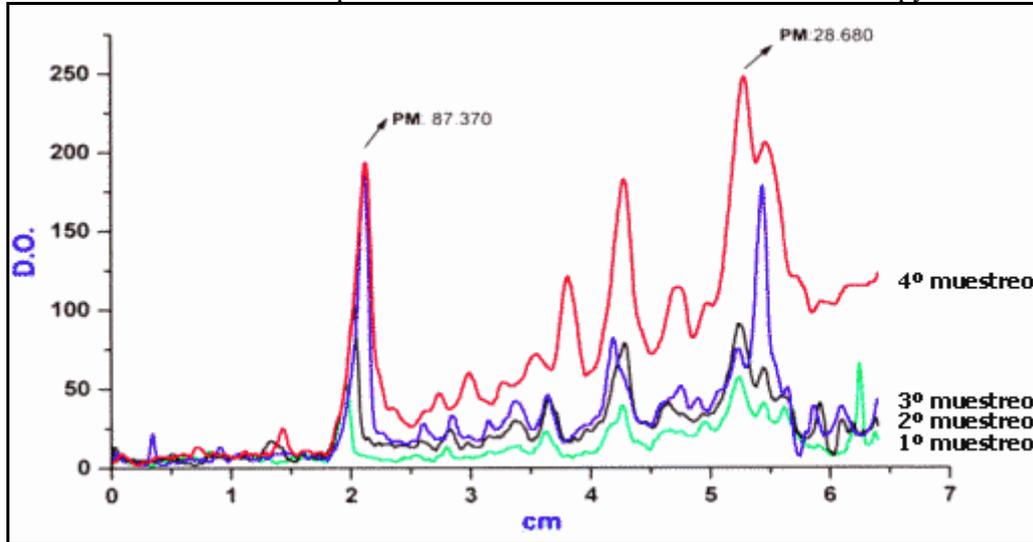
**Identificación bacteriana:** En los MCV se observaron por IF formas compatibles con *Campylobacter fetus* en los 6 muestreos, obteniendo cultivos positivos en 4 de ellos. Las cepas aisladas fueron identificadas con el número del animal, más un número de orden correspondiente a la secuencia del aislamiento (281-1, 281-2, 281-3, 281-4). Cada aislamiento se identificó, de acuerdo a las pruebas bioquímicas citadas anteriormente.

**Electroforesis:** Las corridas electroforéticas coloreadas con Coomassie blue permitieron visualizar bandas proteicas distribuidas en un rango de peso molecular de 29 a 225 kDa, como se observa a manera de ejemplo la cepa del primer muestreo en la figura 1, que fue utilizada para Wester blotting .

**IFI:** Fue negativa para los sueros y MCV enfrentados con las diferentes cepas utilizadas, siendo positiva 1/800 para el suero bovino control.

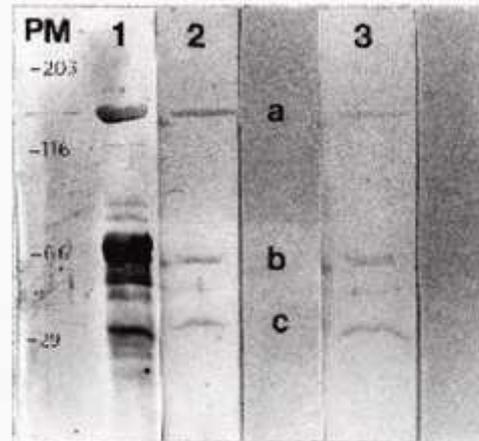
**Determinación de patrones de bandas:** Se encontraron variaciones en las corridas de las bandas proteicas en los diferentes muestreos. (Figura 1)

Figura 1: Análisis densitométrico de proteínas de los diferentes aislamientos de *Campylobacter fetus fetus*



**Western blotting:** No se obtuvo reconocimiento de las bandas proteicas transferidas a nitrocelulosa de las 4 cepas aisladas por los sueros y MCV obtenidos en los diferentes muestreos. Siendo la totalidad de las bandas reconocidas por el suero bovino control (Imagen 1). Las bandas denominadas a, b y c son las reconocidas por sueros y MCV de animales vacunados con bacterinas comerciales (Figura 3).

Figura 3: Wester blotting con cepa C.f. suero de hembra bovina experimentalmente infectada, suero y MCV correspondientes al primer muestreo.



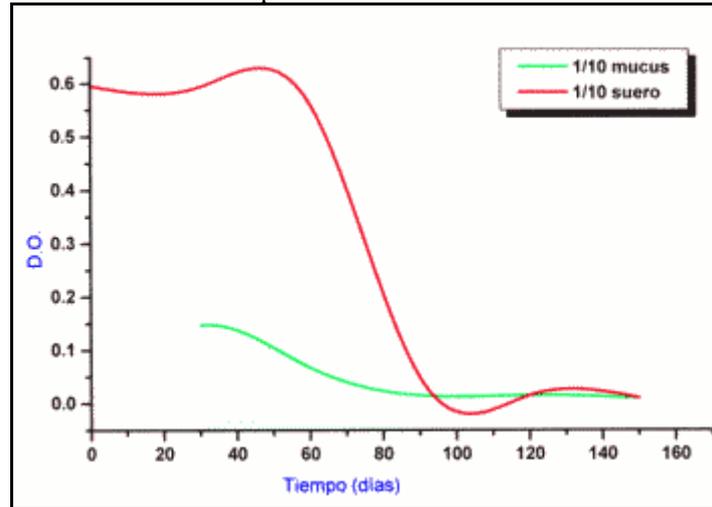
PM: Peso molecular

Línea 1: Bandas reconocidas por suero de animal experimentalmente infectado

Línea 2 y 3: Bandas reconocidas frente a suero y MCV de bovino vacunado, respectivamente

**Enzimoimmunoensayo:** El título máximo obtenido en los diferentes muestreos fue de 1/10. Con dicha dilución se realizó la dinámica de los anticuerpos séricos y del MCV., observándose en el suero la mayor densidad óptica (D.O. 0623) al día 50 descendiendo bruscamente a partir del día 60. El MCV registró su mayor nivel (D.O. 0147) el día 30 para descender en forma moderada, también a partir del día 60. (Figura 2).

Figura 2: Dinámica de anticuerpos de hembra bovina vacunada en suero y MCV



### CONCLUSIONES

- ◆ Se comprobó la persistencia de *Campylobacter fetus fetus* en el área cérvico-vaginal desde los 4 meses de gestación hasta 1 mes post-parto en un animal vacunado con bacterina comercial.
- ◆ Se observaron variaciones en los patrones de las bandas proteicas a través del tiempo.
- ◆ Las inmunoglobulinas presentes en suero y MCV no reconocieron las diferentes bandas antigénicas transferidas a nitrocelulosa (Western blotting).
- ◆ El título de anticuerpos séricos presentes en MCV es bajo (1/10 por ELISA y negativo por IFI).

### DISCUSIÓN

La persistencia de animales infectados con *Campylobacter fetus venerealis* hasta 14 meses fue confirmada por diferentes autores (Corbeil, L. et al 1975, 1981 y Blaser, M.1993), no hallando referencias sobre la persistencia en hembras preñadas vacunadas.

Las variaciones en la migración de acuerdo a los pesos moleculares de las bandas proteicas, en los muestreos indican que podrían estar relacionadas con las variaciones antigénicas que permiten persistir al C. f. en el área cérvico-vaginal (Corbeil, L et al 1981y Blaser, M 1993, Grogono-Thomas, R et al .,1999).

Las proteínas denominadas S-Layer pueden expresarse tanto in vivo como in vitro con diferentes masas moleculares y diferente antigenicidad que permiten evadir la respuesta inmune, sumando a dicha variación, la resistencia de S-Layer al sistema de complemento. En nuestro ensayo dichas proteínas persistieron durante la infección presentando variaciones de PM detectadas por densitometría que podrían estar relacionadas con las variaciones antigénicas que permiten al *Campylobacter fetus* persistir en el área cérvico-vaginal (Corbeil, L et al 1981y Blaser, M 1993, Grogono-Thomas,R et al .,1999).

Lisle, J en 1987 estudia el comportamiento de cepas frente a distintos sueros patrones, encontrando variaciones en la respuesta inmune. En nuestro estudio se obtiene respuesta muy baja en suero y en MCV durante la totalidad del ensayo (títulos máximo 1/10), no encontrando los niveles altos de anticuerpos citados en animales vacunados (Corbeil, L. et al 1974, 1981,1999).

Las bandas proteicas de las diferentes cepas aisladas no son reconocidas en el Western blotting por el suero y MCV del animal, pero son bandas inmunocomprometidas reconocidas por el suero control. Lisle, J et al en 1985 hace referencia a antígenos de *Campylobacter fetus* que podrían ser enmascarados por anticuerpos locales y así ser capaces de evadir el sistema inmune.

Cobeil, J.; 1981 en un ensayo con dos vacas encuentra que sueros con alto título obtenido a los 49 y 61 días de la infección no reconocen las cepas utilizadas como infectantes. Schuring et al., 1973 comprueba que diferentes antígenos son reconocidos por diferentes sueros obtenidos en un ensayo en los muestreos posinfección.

Este estudio abre un nuevo camino de análisis teniendo en cuenta, la persistencia de infección por *Campylobacter fetus fetus* en un animal vacunado y preñado hasta el momento del parto, la no repuesta a un inmunógeno comercial por la vía clásica y el no reconocimiento antigénico por parte de la inmunidad local y sistémica, que implican estudios más profundos sobre los factores inherentes al agente infeccioso y al huésped susceptible en esta enfermedad venérea.

## BIBLIOGRAFÍA

- BLASER, M. Role of the S- Layer proteins of *Campylobacter fetus* in Serum-Resistance and antigenic variation: A model of bacterial pathogenesis. *Inf. Immun.* 306 5 : 325-329.1993
- CATENA M, CALLEJAS S, SOTO P, ABA M, ECHEVARRÍA H, MONTEAVARO C, MAZZOLLI A. Efectos de la infección experimental con *Campylobacter fetus venerealis* sobre la preñez temprana en vaquillonas. *In Vet*; 2003, 1: 37-44.
- CORBEIL, L., Immunization and Diagnosis in Bovine Reproductive Tract Infections. *Adv. Vet. Med.* 41- 217:239 1999
- CORBEIL, L.; CORBEIL, A.; WINTER, A. Bovine venereal vibriosis: Activity of inflammatory cells in protective immunity. *Am. J. Vet. Res.* vol 36, 4 : 403-406. 1975.
- CORBEIL, L.; DUNCAN, J.; SCHURING, G.; WINTER, A. Bovine venereal vibriosis variation in immunoglobulin class of antibodies in genital secretions and serum. *Infect. Immun.* 10, 1084-1090 1974
- CORBEIL, L.; SCHURING, G.; PIER, P.; WINTER, A. Bovine venereal vibriosis: Antigenic variation of the bacterium during infection. *Inf. Immun.* 3, 854 1981
- DUBREIL, J.; KOSTRZYNSKA, M., AUSTIN, J.; TRUST, T. Antigenic differences among *Campylobacter fetus* S-Layer proteins. *J. Bacteriol.* 172. 9: 5035-5043. 1990.
- DUNCAN, J.; WILKIE, B.; Natural and immune antibodies of *Vibrio fetus* in serum and vaginal mucus. *Infect. Immun.* 109: 422-429. 1972.
- GROGONO-THOMAS, R.; DWORKIN, J.; BLASER, M.; NEWELL, D. Roles of the Surface Layer Proteins of *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* in ovine abortion. *Infect. Immun.* 68: 1687-1691. 2000.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685. 1970.
- LISLE, G., A.; PETTETT, A.; WALL, E.; COLLINS D. An examination of *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* by restriction endonuclease analysis and serology. *Vet. Microbiol.* 14: 53-60. 1987
- ON, S Identification Methods for *Campylobacter*, *Helicobacter* and related organisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 9. 3: 405-422 .1996
- TERZOLO, H.; ARGENTO, E, CATENA, M.; CIPOLLA, A.; CORDEVIOLA, J. ; TEJADA, G.; VILLA, J. Procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la campilobacteriosis y trichomoniasis genital bovina. *AAVLD, C.C.P. de Enfermedades Venéreas.* 1: 33. 1993
- TOWBIN, H. ; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 4350-4354. 1979
- VANDAMME P., DEWHIRST F, PASTER, B.J. ON, S. L. W. Genus I. *Campylobacter* .In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second edition, 2005. Ed. Spriger. 1147-1168
- WESLEY, I; BRYNER, J Antigenic and restriction enzyme analysis of isolates of *Campylobacter fetus* subsp *venerealis* recovered from persistently infected cattle. *Am. J. Vet. Res.* vol 50: 807-813. 1989.

[Volver a: Enfermedades de la reproducción](#)