

Diagnóstico de *Campylobacter fetus venerealis* por PCR, en un aborto bovino espontáneo

Diagnosis of *Campylobacter fetus venerealis* in aborted bovine fetus

Bove R¹, López F¹, Perera C¹, Carracelas B²,
Torres-Dini D³, De Souza G², Azambuja C⁴,
Bermúdez J⁵, Alzugaray F⁵, Mederos A² *

Recibido: 25/02/2013
Aprobado: 01/04/2013

RESUMEN

En este trabajo se reporta el diagnóstico de *Campylobacter fetus venerealis* (Cfv) de un aborto bovino espontáneo utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple. La muestra de fluido estomacal fetal fue sometida a otros métodos de diagnóstico para *Campylobacter fetus*: cultivo bacteriano e inmunofluorescencia directa (IFD). Adicionalmente se emplearon marcadores moleculares específicos de CFv que permitieron identificar una banda de 142pb asociada al gen plasmídico parA Cfv. Dicho amplicón fue secuenciado y analizado por blastN. Los resultados de los cultivos bacteriológicos e IFD evidenciaron la presencia de *Campylobacter fetus* y los resultados

SUMMARY

The aim of this study was to report the diagnosis of *Campylobacter fetus venerealis* (Cfv) in a bovine fetus by a multiplex Polymerase chain reaction test (PCR). The sample was submitted to the following diagnostic tests: bacteriological culture and direct immunofluorescence test (DIFT) and specific molecular markers were used for identification of a 142bp segment associated to the Cfv parA plasmid gene. This segment was sequenced and analyzed with BlastN. Results from the bacteriological tests and DIFT demonstrated *Campylobacter fetus* presence, while the molecular methods confirmed Cfv. Sequencing results revealed a 3e-33 e-value with a 99% identity, confirming subspecies *venerealis*.

1 DILAVE Regional Tacuarembó, Ruta 5 km 386, Tacuarembó, Uruguay.

2 Programa Nacional Carne y Lana, INIA Tacuarembó

3 Programa Nacional Forestal, INIA Tacuarembó

4 Laboratorio Genia, Montevideo, Uruguay

5 Departamento de Microbiología, Facultad de Veterinaria, UdelaR, Uruguay.

moleculares identificaron la subespecie *venerealis*. El resultado de la secuenciación reveló un e-value de $3e-33$ con un valor de identidad del 99%, confirmando la subespecie *venerealis*.

PALABRAS CLAVE:

Bovinos, Campylobacter fetus venerealis, aborto, PCR

INTRODUCCIÓN

La *Campylobacteriosis* Genital Bovina (CGB) es una enfermedad de transmisión sexual causada por *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, *C. fetus* subsp. *venerealis* biotipo *intermedius* y *C. fetus* subsp. *fetus* (Campero, 2000). Esta enfermedad se caracteriza por producir infertilidad temporaria en las hembras, mortalidad embrionaria temprana y ocasionales abortos (Campero y col., 2005; Eaglesome y Garcia, 1992). La CGB ha sido reportada en diferentes partes del mundo, en Australia es la principal enfermedad venérea (Aliyu y col., 2005; Hum y col., 2009). En Argentina es considerada la responsable de disminuir la eficiencia reproductiva ocasionando severas pérdidas económicas (Bryner y col., 1964; Campero, 2000). En Uruguay, un estudio realizado por Repiso y col. (2005) reveló una prevalencia de CGB en toros de 28,1% y predial del 37,0%, usando la técnica de inmunofluorescencia directa (IFD) como prueba de diagnóstico.

KEYWORDS:

Bovine, Campylobacter fetus venerealis, abortion, PCR

El diagnóstico de la enfermedad se realiza comúnmente a partir de muestras de esmegma prepucial de toros, mucus vaginal en vacas o contenido abomasal de fetos abortados (Hum y col., 1994; Lander, 1990; McMillen y col., 2006). Existen diferentes técnicas para el diagnóstico: aislamiento por cultivo bacteriano (Hum y col., 1997; Carter, 1990; Stoessel, 1982), IFD y detección de anticuerpos por ELISA. Sin embargo estas metodologías no permiten diferenciar subespecies *venerealis* de *fetus*, para lo cual se necesitan pruebas adicionales bioquímicas como el test de tolerancia a la glicina. Una opción más reciente para la detección a nivel de subespecie, es el diagnóstico molecular por la técnica de PCR convencional o PCR a tiempo real (Hum et al., 1997; McMillen et al., 2006)

C. fetus subsp. *fetus* habita el tracto intestinal de bovinos y ovinos, y esporádicamente puede causar abortos e infertilidad (On y Harrington, 2001, Campero y col., 2003). En contraste, *C. fetus* subsp. *venerealis* está mejor adaptado al tracto reproductivo de los bovinos y no sobrevive en el tracto intestinal de ovinos y bovinos (Wagenaar y col., 2001). El toro actúa como portador asintomático de la enfermedad con persistencia de la infección genital siendo más

prevalente a mayor edad. Para controlar y erradicar la enfermedad se hace por ello necesario contar con metodologías de diagnóstico altamente sensibles y específicas que permitan detectar a los toros infectados en el rodeo (McMillen y col., 2006).

El objetivo del presente trabajo es reportar el diagnóstico de *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* en un caso espontáneo de aborto bovino mediante una técnica de PCR múltiple.

MATERIALES Y MÉTODOS

Necropsia y obtención de muestras

Este trabajo fue realizado en mayo 2011, en los laboratorios de DILAVE Regional Norte e INIA Tacuarembó, Uruguay.

Se recibió y procesó un feto bovino completo y refrigerado de una vaquillona, proveniente de un rodeo de cría de 116 vacas, 100 vaquillonas y 11 toros de un establecimiento ubicado en la 9ª Sección Policial del departamento de Tacuarembó. La longitud del feto fue medida desde la corona hasta la base de la cola; se observó la presencia de pelos en distintas zonas del cuerpo (Costa, 2001) y se inspeccionó la apariencia externa, grado de autólisis, estado de la piel y mucosas y presencia de eventuales alteraciones morfológicas. La necropsia del feto y la obtención de las muestras se realizaron siguiendo el protocolo de Diagnóstico Integral de Abortos de

DILAVE. Se tomaron muestras de fluido estomacal para cultivo, IFD y PCR.

Técnicas de laboratorio

Las muestras de contenido de abomaso fueron sometidas a las siguientes técnicas de laboratorio: cultivos bacteriológicos; IDF directa y PCR múltiple. Los cultivos bacteriológicos fueron procesados según el manual de procedimientos de la Organización Internacional de Epizootias (OIE, 2008). Brevemente, 2 ml de contenido abomasal fueron sembrados en medio de cultivo selectivo y enriquecimiento de Lander (1990) y en los medios no selectivos caldo cerebro corazón (BHI) y agar sangre sin antibióticos (AS). Los medios fueron incubados a 37 °C durante 5 días, en condiciones de microaerofilia utilizando una jarra de anaerobiosis.

El líquido abomasal y las colonias aisladas de los medios de cultivos sólidos, fueron observados al microscopio utilizando extendidos teñidos con técnica de Gram. Las colonias aisladas se conservaron en caldo Mueller Hinton congeladas a -18 °C. La técnica de IFD utilizada fue la descrita por la OIE utilizando el conjugado Campy-azul a una dilución 1:30.

Extracción de ADN bacteriano y condiciones de PCR múltiple

La técnica de PCR fue realizada según Hum y col. (2009). La purificación de ADN a partir del medio

Lander fue realizado de acuerdo al protocolo de CTAB descrito por Mello Groff (2005). Posteriormente y con el fin de realizar la secuenciación se realizó una segunda extracción de ADN a partir de las colonias conservadas en caldo Mueller Hinton. Se utilizaron 500 uL de caldo Mueller Hilton el cual fue centrifugado a 10.000 rpm durante 10 min descartando el sobrenadante. El pellet fue lavado con 500 uL de PBS y centrifugado a 10.000 rpm durante 10 min, descartando el sobrenadante. El pellet final fue resuspendido en 50 uL de agua destilada estéril (Campero, C., 2011)

Condiciones de PCR

Para el diagnóstico molecular se usaron los *primers* específicos de especie MG3 y MG4 y subespecie VenS que producen dos amplicones de 760 y 142 pb respectivamente, en las muestras positivas (Hum y col., 1997). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 µl conteniendo: 1X Buffer, 0.4 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 µM de cada cebador VenS y 1,0 µM de MG3 y MG4, 0,7 U de Taq ADN Polimerasa y 2 uL de ADN molde. El programa de ciclado fue 94 °C, 3min; [36 ciclos (94 °C, 40s; 54 °C, 60s; 72 °C, 40s)]; 72 °C, 5 minutos. Como control de reacción negativo se empleó 2 uL de agua destilada estéril en presencia de la mezcla de reacción. Para el control positivo se usó una cepa de *C. fetus venerealis* proporcionada por Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo, Uruguay.

Secuenciación y análisis de BLAST

Para la secuenciación se realizó una PCR simple con los cebadores VenS. El producto de PCR fue secuenciado en un secuenciador Automático ABI3130 (Applied Biosystem; CA, EEUU). La secuencia fue analizada mediante el empleo del algoritmo BLASTn comparándose contra la base de datos de secuencias nucleotídicas (nr/nt) del NCBI.

RESULTADOS

El feto en estudio provenía de un rodeo compuesto por 126 vacas y 100 vaquillonas entoradas (70 y 30 preñadas respectivamente) y 11 toros.

El feto abortado tenía 5 meses de gestación midiendo desde la corona a base de cola 46 cm con presencia de pelos en el arco supraciliar, labios y quijadas, punta de cola y rodetes coronarios. El estudio histopatológico reveló un infiltrado polimorfonuclear en pulmón, en hígado focos de necrosis e infiltrado linfocitario en espacios porta y meningitis en sistema nervioso central. En los demás órganos no se encontraron lesiones de significación patológica. Las muestras provenientes del feto y de la madre fueron negativos a Brucelosis, Neorporosis y Leptospirosis bovina. En los cultivos bacteriológicos se observaron colonias compatibles con *C. fetus* en las placas sembradas a partir del BHI y en el AS. Las colonias presentaron morfología típica de dicho

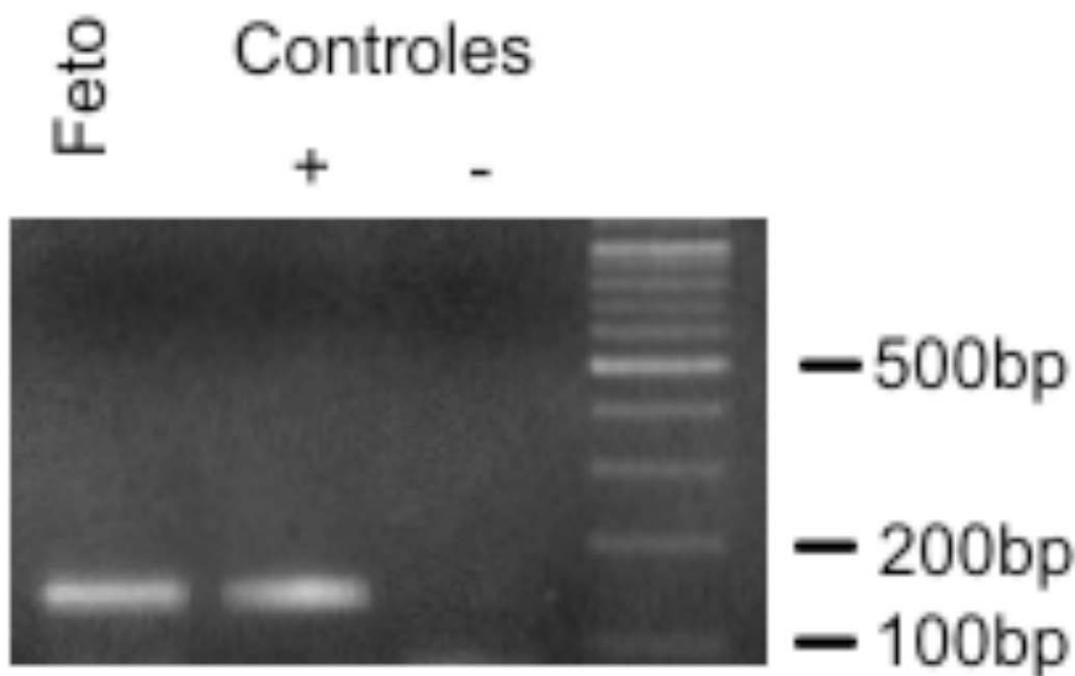


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa donde se observa la presencia de un amplicon de 140bp correspondiente al gen parA, en muestra fetal (línea 1), identificando la presencia de *C. fetus* subsp. *venerealis*. La línea 2 (+) corresponde al control positivo *C. fetus venerealis*; la línea 3 al control negativo mezcla de reacción sin ADN y línea 4 al ladder de 100 pb Plus.

microorganismo siendo de 1-3 mm de diámetro, ligeramente grisáceas-rojizas, redondas, lisas y con bordes regulares. Se observó crecimiento bacteriano en pureza. Mediante microscopía óptica y tinción de Gram se confirmó la presencia de bacilos Gram negativos con forma de “S” típicos del género *Campylobacter*.

El análisis de IFD realizado sobre el contenido abomasal también resultó positivo para *C. fetus*.

Diagnóstico molecular: PCR, secuenciación y BLAST

Se logró amplificar dos fragmentos, uno de 760 pb y otro de 142 pb a partir del líquido abomasal así como del control positivo, mientras que no hubo amplificación en el control negativo. En la Figura 1 se observa el resultado de la PCR realizada únicamente con los cebadores VenS a partir de la cual se realizó la secuenciación. El análisis por blastN resultó en un e-value de $3e-33$, con un valor de identidad del 99% al gen parA de CFV (Hum y col., 1997; Willoughby y col., 2005).

DISCUSIÓN

Mediante la técnica de PCR múltiple se pudo confirmar el diagnóstico de *C.fetus venerealis* como el responsable del aborto bovino utilizando contenido del abomaso fetal.

Las características biológicas de Cfv hacen que su cultivo y aislamiento como estrategia de diagnóstico resulte un proceso lento, costoso y poco práctico. Las muestras prepuciales y vaginales muestran morfología característica luego de 48hs en condiciones de microaerofilia, pero en este caso no se tuvo acceso a dicho material. Este tipo de cultivos son susceptibles del desarrollo de otros microorganismos debido al lento desarrollo que presentan las colonias de Cfv lo que no le da precisión al diagnóstico (Lander, 1990). Al utilizar en el presente caso fluido abomasal representó una gran ventaja desde el punto de vista microbiológico por su pureza, facilitando aislamiento y caracterización taxonómica, en coincidencia con otros autores (Hum y col., 1997; McMillen y col., 2006). Por ello, una de las estrategias de control es obtener material para diagnóstico prepucial de los toros que se utilizan en el rodeo y el mucus cérvico vaginal de las hembras abortadas

La técnica de IFD resulta de utilidad práctica con adecuada sensibilidad y especificidad para ser utilizada a partir del fluido estomacal permitiendo la detección directa sin el cultivo microbiológico. En

contrapartida, no tiene la capacidad de diferenciar la subespecie de *C. fetus* actuante (Martinez y col., 1986).

La información generada con los métodos moleculares de PCR, secuenciación y blast no solo validó los resultados de las otras técnicas de diagnóstico que se implementaron, sino que además permitió llegar al diagnóstico de subespecie al mostrar un 99% de correspondencia al gen parA de CFV (Hum y col., 1997; Willoughby y col., 2005). A su vez estas metodologías son ajustables a muestras de campo las cuales una vez puestas a punto y validadas no requieren de cultivos bacteriológicos para posteriormente realizar el diagnóstico de subespecie a partir de las colonias sospechosas (McMillen y col., 2006; Tedesco y col., 1977). Esta cualidad es una ventaja en comparación con las técnicas tradicionales ya que permitiría el trabajo con muestras a una escala mayor y a menor tiempo. Uno de los objetivos más importantes del diagnóstico molecular es contar con protocolos de muestreo de campo eficientes que aseguren la presencia de ADN amplificable (McMillen y col., 2006; Mello Groff, 2005; Schmidt, 2008). Una vez definidos dichos protocolos, los tiempos del diagnóstico pueden reducirse a unas pocas horas para el caso de la PCR convencional y más aún si se trata de PCR en tiempo real al poder prescindir de la etapa de electroforesis, logrando además una sensibilidad mayor (McMillen y col., 2006; Pestana

y col., 2010). El contar con técnicas de diagnóstico altamente específicas y sensibles contribuirá a la realización de estudios epidemiológicos y a la aplicación de métodos de control, que contribuyan a reducir las pérdidas económicas ocasionadas en los sistemas de cría bovina de nuestro país.

CONCLUSIÓN

Este trabajo demuestra que es posible llegar a un rápido diagnóstico de Cfv, utilizando métodos moleculares utilizando la técnica de PCR múltiple siguiendo los protocolos descritos en la literatura. Más trabajos son necesarios para poner a punto protocolos de trabajo adaptados a las condiciones de nuestro medio.

Contribución de los autores

R. Bove, F. López y C. Perera fueron responsables de la necropsia del feto, toma de muestras, pruebas de IFD y cultivos bacteriológicos. Carracelas, B.; Torres, D, G. De Souza; F. Alzugaray llevaron adelante los trabajos de PCR; Azambuja, C. realizó los trabajos de secuenciación; Bermúdez, J. asesoró los trabajos de bacteriología y A. Mederos colaboró en la organización del manuscrito y coordinación de los trabajos de laboratorio.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. R. González por realizar el trabajo de campo; a los Dres. B. Nosedá y A. Martínez de Laboratorio Azul de Argentina por asesoramiento en la técnica de IFD; a la Dra. M.C. Agueda Castagna de Vargas de la Universidad de Santa María, Brasil por el asesoramiento en la técnica de PCR y al Dr. C. Campero de INTA Balcarce, República Argentina.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aliyu SH, Yong PF, Newport MJ, Zhang H, Marriott RK, Curran MD, Ludlam H. (2005). Molecular diagnosis of *Fusobacterium necrophorum* infection (Lemierre's syndrome). Eur J Clin Microbiol Infect Dis 24: 226–229.
2. Bryner JH, O'Berry PA, Frank AH. (1964). *Vibrio* infection of the digestive organs of cattle. Am J Vet Res 25:1048-1050.
3. Campero CM, Anderson ML, Walker RL, Blanchard PC, Barbano L, Chiu P, Martínez A, Combessies G, Bardon JC, Cordeviola J. (2005). Immunohistochemical identification of *Campylobacter fetus* in natural cases of bovine and ovine abortions. J Vet Med 52:138-41.
4. Campero CM. (2000). Las enfermedades reproductivas de los bovinos: ayer y hoy. Acad Nacional Agronom Vet Anales 53:88-112.

5. Campero CM, Moore DP, Odeón AC, Cipolla AL, Odriozola E. (2003). Etiology of bovine abortion in Argentina. *Vet Res Comm* 27: 359-369
6. Carter GR, Cole JR. (1990). *Diagnostic procedure in veterinary bacteriology and micology*. 5th ed. New York, Academic Press, p 268-272.
7. Costa E. (2001). Seminario JICA/DILAVE. INIA Tacuarembó, Uruguay.
8. Eaglesome MD, Garcia MM. (1992). Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen. Part I. *Vet Bull* 62:758-768.
9. Errico F, Repiso MV, Herrera B. (1988). Las enfermedades venéreas de los bovinos en el Uruguay. Curso sobre Fisiopatología de la Reproducción Bovina, Asunción, Paraguay, 169-191.
10. Hum S, Hornitzky M, Berg T. (2009). Bovine Genital *Campylobacteriosis*. Australia and New Zealand Standard Diagnostic Procedures, 19 p.
11. 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.
12. Hum S, Brunner J, McInnes A, Mendoza G, Stephens J. (1994). Evaluation of cultural methods and selective media for the isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* from cattle. *Aust Vet J* 71:184-186.
13. Lander KP. (1990). The application of a transport and enrichment medium to the diagnosis of *Campylobacter fetus* infections in bulls. *Br Vet J* 146: 334-340.
14. Martinez AH, Bardon JC, Nosoda BP, Cordeviola JM, Sarmiento F, Gau JA. (1986). Herd diagnosis on Trichomoniasis and *Campylobacteriosis* in bovines utilizing the empty cow as indicator. *Vet Arg* 111:962-966.
15. McMillen L, Fordyce G, Doogan VJ, Lew AE. (2006). Comparison of culture and novel 5' Taq nuclease assay for direct detection of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* in clinical specimens from cattle. *J Clin Microbiol* 44:938-945.
16. Mello Groff ACM. (2005). PCR para o diagnóstico da campilobacteriose genital bovina. Mestrado em Medicina Veterinaria, Universidad de Santa María, Santa Maria, Brasil.
17. 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.%20Campilobact%20g.%20bovina.pdf. Última visita: julio de 2011.
18. On SL, Harrington CS. (2001). Evaluation of numerical analysis of PFGE-DNA profiles for

- differentiating *Campylobacter fetus* subspecies by comparison with phenotypic, PCR and 16S rDNA sequencing methods. *J Appl Microbiol* 90:285-293.
19. Pestana EA, Belak S, Diallo A, Crowther JR, Viljoen GJ. (2010). Early, rapid and sensitive veterinary molecular diagnostics – Real time PCR applications. Dordrecht, Springer Science+Business Media 310 pp.
20. Repiso MV, 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.
21. Schmidt T. (2008). Detection of *Campylobacter fetus* in bovine preputial scrapings using PCR and culture assays. Master's Thesis, University of Pretoria, Pretoria, South Africa.
22. Stoessel, F. (1982). Las enfermedades venéreas de los bovinos: trichomoniasis y vibriosis genital. Editorial Acribia, España. 163 pp.
23. Tedesco LF, Errico F, Baglivi LP. (1977). Comparison of three sampling methods for the diagnosis of genital vibriosis in the bull. *Aust Vet J* 53:470-472.
24. 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.
25. Willoughby K, Nettleton PF, Quirie M, Maley MA, Foster G, Toszeghy M, Newell DG. (2005). Multiplex polymerase chain reaction to detect and differentiate *Campylobacter fetus* subspecies *fetus* and *Campylobacter fetus* subsp *venerealis*: use on UK isolates of *C. fetus* and other *Campylobacter* spp. *J Appl Microbiol* 99: 758–766.