

# CAMPYLOBACTER FETUS SUBSP. VENEREALIS Y PRESUNTA NEOSPOROSIS COMO CAUSA DE ABORTOS EN UN RODEO LECHERO DE URUGUAY CON ALTOS TÍTULOS DE ANTICUERPOS PARA *Leptospira interrogans* SEROVARES POMONA, HARDJO-PRAJITNO, WOLFFII Y HARDJO-BOVIS.

Melissa Macías Rioseco<sup>1</sup>, Darío Caffarena<sup>1</sup>, Martín Fraga<sup>1</sup>, Federico Giannitti<sup>1,2</sup>, Yarbel Berrueta Wilkins<sup>3</sup>, Laura Casaux<sup>1</sup>, Alejandra Suanes<sup>4</sup>, Leandro Fernández<sup>4</sup>, Pedro Bañales<sup>4</sup>, Caroline da Silva Silveira<sup>1</sup>, Franklin Riet-Correa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Plataforma de Investigación en Salud Animal, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), La Estanzuela, Uruguay. <sup>2</sup>University of Minnesota, Saint Paul Minnesota, EUA. <sup>3</sup>Veterinario de Actividad Liberal, Uruguay. <sup>4</sup>Dirección de Laboratorios Veterinarios, Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, Uruguay. \*Autor de correspondencia: mmacias@le.inia.org.uy.

## RESUMEN

Veterinarios de la Plataforma de Investigación en Salud Animal del INIA, realizaron necropsias de cinco fetos bovinos abortados de cinco vacas Holstein durante noviembre del 2015. Las vacas pertenecían a un tambo comercial localizado en el departamento de Florida, Uruguay. Se realizaron varias pruebas diagnósticas, incluyendo histología, inmunohistoquímica, serología, inmunofluorescencia directa (IFD), cultivo bacteriano y secuenciación del ADNr 16S. Macroscópicamente en un feto se encontró epicarditis fibrinosa, y microscópicamente se constató además bronconeumonía neutrofílica en el mismo feto. *Campylobacter fetus* fue aislado del líquido abomasal y pulmón y detectado por IFD de líquido abomasal en este feto. La identificación molecular de los aislamientos bacterianos corroboró *C. fetus* subsp. *veneralis*. El estudio histológico de otros dos fetos reveló encefalitis no supurativa y necrotizante, miositis/miocarditis no supurativa y nefritis intersticial linfocítica, lesiones altamente sugestivas de infección activa por *Neospora caninum*. La presencia de *N. caninum* en el tambo fue confirmada por la identificación de anticuerpos anti-*Neospora caninum* en 10 de 27 vacas, con títulos que variaban de 1/200 a 1/3200. Se detectaron títulos de anticuerpos de 1/200-1/3200 contra *Leptospira interrogans* serovares Pomona, Hardjo-prajitno, Wolffii y/o Hardjo-bovis en un total de 15 de 18 vacas del rodeo afectado. Los resultados nos permiten confirmar a *C. fetus* subsp. *veneralis* como agente causal del aborto en uno de los fetos, sospechar fuertemente de la acción abortiva de *N. caninum* en dos de ellos, y confirmar la circulación de *N. caninum*

además de *L. interrogans*, otro agente abortivo, en el rodeo afectado. No se arribó a un diagnóstico etiológico en dos de los fetos analizados. Concluimos que varios microorganismos pueden coexistir y causar abortos en animales de un mismo establecimiento, lo cual resalta la necesidad de realizar múltiples pruebas diagnósticas en fetos y vacas abortadas para confirmar los diagnósticos etiológicos del síndrome de aborto bovino.

## SUMMARY

Veterinarians from the Animal Health Platform at the National Institute of Agriculture Research necropsied five bovine fetuses from five aborted Holstein cows in November 2015. The animals were from a commercial dairy farm in Florida department, Uruguay. Several diagnostic test were performed, including histology, immunohistochemistry, serology, direct immunofluorescence assay (IFA), bacterial cultures and bacterial 16S rDNA sequencing. Macroscopically one fetus had fibrinous epicarditis and the histologic examination revealed concurrent neutrophilic bronchopneumonia. *Campylobacter fetus* was isolated from lung and abomasal fluid, and detected by IFA from abomasal fluid in this fetus. Bacterial DNA sequencing confirmed *Campylobacter fetus* subsp. *veneralis*. Histologic examination of two other fetuses revealed non-suppurative necrotizing encephalitis, non-suppurative myositis/myocarditis, and lymphocytic interstitial nephritis, all of which are highly suggestive of active *Neospora caninum* infection. The presence of *N. caninum* in the herd was confirmed by detection of antibodies against the microorga-

nism in 10 out of 27 cows, with titers ranging from 1/200 to 1/3200. Antibody titers against *Leptospira interrogans* serovars Pomona, Hardjo-prajitno, Wolffi and/or Hardjo-bovis varying from 1/200 to 1/3200 were detected in a total 15 of 18 cows from the affected herd. In brief, *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* was confirmed as the etiology of the abortion in one of the fetuses and *N. caninum* was highly suspected in other two, while no etiology was detected in the remainder fetuses. Circulation of various abortigenic agents, *N. caninum* and *L. interrogans*, was confirmed serologically in the affected herd. In conclusion, various abortigenic microorganisms may coexist and cause abortion in a particular herd. This highlights the importance of performing extensive panels including multiple diagnostic tests in fetuses and aborted dams for the etiologic confirmation in cases of bovine abortion syndrome.

## INTRODUCCIÓN

*Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* es el agente causal de la campilobacteriosis genital bovina (Michi et al. 2016). Los toros pueden ser portadores de la bacteria en el prepucio por tiempo indefinido, y las hembras infectadas pueden manifestar infertilidad, muerte embrionaria y aborto. Los abortos pueden ocurrir a cualquier edad gestacional, pero son más comúnmente detectados a partir del cuarto al sexto mes de gestación (Vargas et al. 2002). Las lesiones causadas por *C. fetus* subsp. *venerealis* incluyen endometritis, edema intercotiledonario en la placenta, presencia de fluidos sanguinolentos en cavidades corporales o exudados de fibrina en las superficies serosas fetales (Maxie 2015).

El protozoo *Neospora caninum* es una de las principales causas de aborto, tanto en bovinos de leche como de carne (Moore 2005). Los cánidos son los huéspedes definitivos y eliminan los ooquistes en la materia fecal (Donahoe et al. 2015). Las vacas se infectan por *N. caninum* al ingerir los ooquistes que son excretados por el huésped definitivo, o por transmisión vertical. Los huéspedes definitivos se infectan ingiriendo bradizoitos enquistados en tejidos de fetos o placentas infectadas. Si el feto sobrevive y nace infectado, permanece infectado por el resto de su vida. Luego de ocurrir la muerte fetal por *N. caninum*, las vacas pueden expulsar fetos frescos o retener y expulsar posteriormente fetos

momificados hasta varios meses después. Los abortos causados por *N. caninum* ocurren más frecuentemente durante el quinto y sexto mes de gestación (Maxie 2015). Los terneros infectados congénitamente pueden no presentar signos o presentar debilidad perinatal y tener títulos de anticuerpos elevados contra el microorganismo (Kashiwazaki et al. 2004). Los hallazgos de necropsia son escasos. El feto puede estar autolítico o momificado. En la placenta puede observarse necrosis de los cotiledones, sin afectación de la región intercotiledonaria. El corazón, músculo esquelético y cerebro pueden presentar focos grises a blancos representando necrosis, inflamación y/o mineralización. Las principales lesiones microscópicas fetales son encefalitis necrotizante multifocal y miocarditis/miositis no supurativas, y en fetos bovinos son altamente específicas de este protozoo (Maxie 2015). Es común también observar nefritis, neumonía intersticial y necrosis hepática.

Los abortos descritos en este trabajo ocurrieron en un rodeo lechero con 650 vacas en ordeño, en sistema semiextensivo con periodos de encierro que variaban dependiendo de la disponibilidad forrajera. La producción diaria promedio era de 20 L/vaca. La temporada pico de parto era en otoño con servicios de mayo a octubre por inseminación artificial, seguido de un repaso con toros. El predio afectado trabajaba en conjunto con un segundo tambo, donde se recibían vacas con más de 2 meses de paridas y se inseminaban. Estas mismas vacas entraban a periodo de secado al alcanzar el séptimo mes de gestación. Abortaron 45 vacas durante tres semanas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las necropsias fetales y exámenes histológicos se realizaron siguiendo los protocolos estándares. Los tejidos fetales fueron fijados en formalina al 10%, teñidos con hematoxilina y eosina, y examinados bajo microscopio óptico. Algunos tejidos fueron seleccionados y sometidos a dos protocolos de inmunohistoquímica (IHQ) para detección de *Leptospira* spp. y virus de la Diarrea Viral Bovina (vDVB) en el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario de la Universidad de Minnesota. Títulos de anticuerpos contra *Leptospira* spp. fueron determinados por microaglutinación (MAT) en líquido de cavidad de los 5 fetos, y en

suero de 18 vacas (con previa historia clínica de aborto y controles). La búsqueda de *Campylobacter* se efectuó por cultivo en el medio de Skirrow a 37°C con un ambiente microaeróbico con 5-10% de oxígeno y 5-10% dióxido de carbono, durante 4 días. La inmunofluorescencia directa (IFD) se ejecutó con 20 microlitros de líquido abomasal fetal, fijado en acetona a -20°C por 30 minutos en láminas de vidrio, añadiendo el antisuero conjugado en una cámara húmeda a 37°C por 30 minutos, usando controles apropiados. Para la identificación molecular de los aislamientos se extrajo el ADN genómico empleando el sistema comercial "Gene bacterial genomic DNA extraction kit" (Invitrogen, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, seguido por la amplificación de un fragmento del gen que codifica para el ARNr 16S, empleando los cebadores universales para el Dominio Bacteria 27F y 1492R. Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados por Macrogen Inc., Seúl, Corea del Sur. Las secuencias obtenidas se compararon con secuencias ya publicadas en dos bases de datos utilizando la herramienta "Classifier" del "Ribosomal Database Project" (RDP) y BLASTn del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Se realizó inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos anti-*Neospora caninum* del suero de 27 animales, siguiendo protocolos de la Dirección de Laboratorios Veterinarios, del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cinco fetos (1-5) de 180 días de edad aproximada fueron necropsiados. Sólo el feto 1 presentó lesiones macroscópicas significativas, que consistieron en epicarditis fibrinosa severa difusa. Histológicamente se observó además bronconeumonía neutrofílica en este feto. *Campylobacter fetus* fue aislado del líquido abomasal y pulmón e identificado por IFD en el líquido abomasal de este feto. La secuenciación del gen DNAr 16S de los aislamientos bacterianos corroboró *C. fetus* subsp. *venerealis*. No se aisló *Campylobacter* spp. de muestras de los fetos 2 a 5. Histológicamente en los fetos 4 y 5 se encontró encefalitis multifocal no supurativa y necrotizante, miocarditis/miositis no supurativa y nefritis intersticial no supurativa. En base a esas lesiones se realizó el diagnóstico presuntivo de aborto por *N. caninum*. Además, se detectaron títulos de anticuerpos anti-*N. caninum* con un rango

de 1/200 a 1/3200 en 10 vacas del establecimiento. El vDVB fue descartado por medio de IHQ de hígado, corazón y/o pulmón en los fetos 2, 4 y 5. La IHQ para *Leptospira* spp. fue negativa en riñón y/o hígado de todos los fetos. No se encontraron lesiones en dos de los cinco fetos analizados, y en ninguno de los cinco casos se recibió la placenta para estudios patológicos y microbiológicos. No se detectaron títulos de anticuerpos a *Leptospira* spp. en los fluidos fetales, sin embargo se detectaron títulos contra *L. interrogans* en 15/18 vacas, incluyendo los serovares Pomona (13 vacas), Hardjo-prajitno (9 vacas), Wolffii (9 vacas) y Hardjo-bovis (7 vacas), con títulos en rangos de 1/200 a 1/3200 para las 3 primeras serovares y de 1/200 a 1/1600 para la última. Doce de las 15 vacas presentaban títulos a más de un serovar. Ninguna de las 18 vacas presentaba títulos a los serovares Bratislava, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae o Canicola.

Los casos colectivos de aborto deben ser analizados como un problema que puede ser causado por diversos agentes (multifactorial). El rodeo afectado en este brote realiza inseminación artificial seguida por un repaso con toros no analizados para enfermedades venéreas, lo que incrementa el riesgo de transmisión de estas enfermedades y debería ser evitado. En este brote se confirmó el diagnóstico de aborto por *C. fetus* subsp. *venerealis* en uno de los fetos, al mismo tiempo que se demostraron lesiones histológicas altamente compatibles con neosporosis en otros 2 fetos. Los elevados títulos de anticuerpos contra *N. caninum* y *L. interrogans* demuestran que varios agentes abortivos están circulando en el rodeo problema y que podrían haber contribuido a las pérdidas; sin embargo no se pudieron demostrar infecciones fetales con estos dos agentes mediante las pruebas diagnósticas realizadas en estos fetos.

## CONCLUSIÓN

Varios microorganismos pueden coexistir en un mismo rodeo causando pérdidas reproductivas. En estos casos el diagnóstico etiológico de los abortos es complejo y requiere de estudios que involucren una investigación epidemiológica detallada, de la realización de múltiples pruebas diagnósticas de laboratorio, tanto en los fetos como en las madres, y de un equipo multidisciplinario que pueda

realizar una correcta interpretación de los resultados en su conjunto, lo cual representa un desafío en las investigaciones diagnósticas del síndrome de aborto bovino. Realizar un correcto diagnóstico etiológico es fundamental para poder estimar las pérdidas que los distintos agentes generan en la ganadería nacional y formular recomendaciones para el control de las enfermedades abortivas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Donahoe SL, et al. 2015: "A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife" *Int J Parasitol Parasites Wildl.*4(2):216-38.
- Kashiwazaki Y, et al. 2004: "Seroepidemiology of neosporosis in dairy cattle in Uruguay" *Vet Parasitol.* 26; 120 (1-2):139-44.
- Maxie G. 2015. *Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals: 3-Volume Set, 6th Edition.* Elsevier. pp: 406-408 y 421-423.
- Michi AN, et al. 2016: "A review of sexually transmitted bovine trichomoniasis and campylobacteriosis affecting cattle reproductive health" *Theriogenology.* 15:85 (5):781-91.
- Moore DP, 2005: "Neosporosis in South America". *Vet Parasitol.* 127 (2):87-97.
- Vargas AC, et al. 2002: "Campylobacter fetus subspecies venerealis surface array protein from bovine isolates in Brazil". *Curr Microbiol.* 45(2):111-4.