

CABIDO, M.R., ZAK, M.R., BIURRUN, F.N.M. ZAK. 2019. La vegetación y el ambiente de la provincia de La Rioja. Editorial UNDeC. Ecoval Ediciones. P. 136.

• CABRERA, A.L. 1976. "Regiones Fitogeográficas de Argentina". Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. Tomo II. Fascículo I. Editorial ACME. S. A. C. I. p.85.

• EŞKI, F., I. TAŞAL, M. A. KARSLI, S. ŞENDAĞ, B. A. USLU, H. WAGNER, A. WEHREND. 2015.

Concentrations of NEFA, β -HBA, triglycerides, and certain blood metabolites in healthy colored Angora goats during the peripartum period. Turk. J. Vet. Anim. 39, 401-405.

• HUYEN, N.T, WANAPAT, M., NAVANUKRAW, C. 2012. Effect of mulberry leaf pellet (MUP) supplementation on rumen fermentation and nutrient digestibility in beef cattle fed on rice straw-based diets. Anim. Feed Sci. Technol.;175:8-15.

Identificación de *Campylobacter fetus* por cultivo y real time PCR en muestras prepuciales de toros.

Rafael Delpiazso¹, Lucía Calleros², Maila Barcellos², Fernando Paolicchi³, Claudia Morsella³, Caroline Silveira⁴, Martín Fraga⁴, Franklin Riet-Correa⁴, Jorge Gil⁵.

¹Departamento de Salud de los Sistemas Pecuarios, Bovinos de Carne, Facultad de Veterinaria, EEMAC, Paysandú. Mail: rdelpiazso@gmail.com

²Sección Genética Evolutiva, Facultad de Ciencias, Montevideo.

³Laboratorio de Bacteriología, Estación Experimental Balcarce, INTA. Argentina.

⁴Plataforma de Investigación en Salud Animal, Estación Experimental INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay.

⁵Laboratorio de Reproducción Animal "Dr. A. Ferraris", EEMAC, Paysandú, CENUR Litoral Norte.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue determinar la sensibilidad y especificidad de la técnica de real time PCR (qPCR) comparándola con el cultivo microbiológico (*gold standard*) de *Campylobacter fetus* (*C. fetus*), a partir de la misma muestra de esmegma prepucial. Se obtuvieron muestras de esmegma prepucial de 315 toros diferentes de 62 establecimientos, las cuales se procesaron y analizaron siguiendo el mismo protocolo. Se cultivaron en medio de cultivo Skirrow y se realizó la qPCR dentro de las 24 horas de obtenidas. Tomando como referencia el cultivo, la sensibilidad estimada de la qPCR fue del 100% y la especificidad del 99,4%. La proporción de casos positivos de *C. fetus* por toro fue de 2,2% por cultivo, y de 2,9% por qPCR. Los establecimientos con presencia de *C. fetus* fueron 9,7% por cultivo,

y 12,9% por qPCR, sin diferencias estadísticamente significativas entre ambas técnicas. En conclusión, la qPCR utilizada es una técnica de *screening* adecuada para la detección de *C. fetus* directamente a partir de muestras de esmegma prepucial.

Summary

The aim of the study was to estimate the sensitivity and specificity of a real time PCR technique (qPCR) comparing it with the culture and isolation (*gold standard*) of *Campylobacter fetus*, performing the two techniques directly from the same sample of preputial smegma. Twelve samplings were made, obtaining 315 preputial smegma samples from discarded bulls sent to the slaughter plant and from farms with suspicion of the disease.

All samples were processed following the same protocol. They were cultured in Skirrow medium and the qPCR was performed simultaneously. The estimated sensitivity of the qPCR was 100% and the specificity was 99.4%. The presence of *C. fetus* per bull was 2.2% by culture and isolation, and 2.9% by qPCR. The establishments with presence of *C. fetus* were 9.7% by culture and isolation, and 12.9% by qPCR, without statistically significant differences in the comparison. In conclusion, the qPCR used is a screening technique suitable for the detection of *C. fetus* directly from samples of preputial smegma.

Introducción

La campylobacteriosis genital bovina (CGB) es una enfermedad que causa infertilidad en rodeos de cría de nuestro país (Repiso y col. 2005). El cultivo microbiológico se considera la técnica de referencia para el diagnóstico e identificación de *C. fetus* y sus subespecies (OIE, 2017). Sin embargo, este método presenta algunas dificultades: la alta contaminación con otros microorganismos de las muestras que se obtienen (esmegma prepucial, mucus vaginal y fetos abortados) (Lander, 1990), y condiciones microaerófilas específicas que se requieren para su crecimiento, acompañadas de un lento desarrollo, entre otras. Las dificultades de crecimiento y la falta de reproducibilidad de las técnicas de cultivo motivaron el desarrollo de herramientas de diagnóstico molecular. Se han evaluado diferentes técnicas de PCR para la correcta identificación de la especie y las subespecies de *Campylobacter fetus* (Hum et al., 1997, Abril et al., 2007; Van Bergen et al., 2005) con aspectos en común pero también con algunas diferencias (van der Graaf-van Bloois et al., 2013). El objetivo de este trabajo fue estimar la sensibilidad y especificidad de una técnica de PCR en tiempo real (qPCR) comparándola con el cultivo de *Campylobacter fetus* (*gold standard*), utilizando la misma muestra de esmegma prepucial para ambas técnicas.

Materiales y Métodos

Se obtuvieron muestras de esmegma prepucial de 315 toros diferentes, de 62 establecimientos. Se realizaron en total 12 muestreos: 4 en distintos establecimientos con sospecha de la enfermedad (donde se obtuvieron muestras de esmegma prepucial de 70 toros); y 8 en frigoríficos (donde se obtuvieron muestras de esmegma prepucial de 245 toros, de 58 establecimientos diferentes). Todas las muestras se procesaron y analizaron siguiendo el mismo protocolo: se sembraron 150 μ L de la muestra en Medio Skirrow (OIE, 2017), se incubaron a 37 °C en atmósfera microaerofílica (CampyGen®, 5-10% de oxígeno, 5-10% de dióxido de carbono y 5-9% de hidrógeno) durante 48 horas. Las colonias sospechosas se observaron al microscopio por contraste de fases y se resembraron en medio de cultivo agar sangre Columbia para obtener el aislamiento de *C. fetus*. Las subespecies de las cepas se identificaron fenotípicamente por la prueba de tolerancia a glicina al 1% y la prueba de producción de sulfuro de hidrógeno (H_2S) en un medio con Triple Sugar Iron (TSI) (OIE, 2017). A su vez, se realizó la qPCR (Iraola et al., 2016): se utilizaron un par de primers que amplifican una secuencia de 78 pb del gen 16S rRNA y una sonda TaqMan-MGB que se dirige a una región polimórfica de 19 pb que detecta cepas de *C. fetus* para diferenciarlas de otras especies de *Campylobacter* y de otras bacterias. Se realizó la extracción de ADN con un método de *fastboiling* (Schunck et al. 1995) a partir de 500 μ L de esmegma prepucial en PBS. Las muestras se agruparon en pools de 5 muestras. La qPCR se realizó con un volumen final de 25 μ L: 1 \times TaqMan Genotyping Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, EE. UU.), 1 \times Custom TaqMan SNP Genotyping Assay (0,9 μ M cada primer y 0,2 μ M de la sonda) y 1 μ L del ADN correspondiente a un pool de muestras. El ciclado se realizó en un equipo ABI Prism 7500 (Applied Biosystems). Cuando se detectaba un pool positivo, se repetía la qPCR con cada muestra individual para identificar la muestra positiva. Se calcularon la sensibilidad y especificidad de la qPCR y el valor de concordancia kappa (Thrusfield, 1995) entre el cultivo y la qPCR, utilizando el software Epidat 3.1. La es-

timación del porcentaje de positivos se realizó por el método de Wilson Score, estableciendo la media estimada, y los rangos entre el límite inferior y el límite superior, con un intervalo de confianza del 95% (Wilson, 1927; Boomsma, 2005).

Resultados y Discusión

Se obtuvieron 7 aislamientos de *C. fetus*, y 308 cultivos negativos. De estos 7 aislamientos, 6 se identificaron por pruebas bioquímicas como *C. fetus venerealis* y 1 como *C. fetus fetus*. En cuanto a la qPCR, se obtuvieron 9 reacciones positivas en muestras individuales. De los 62 establecimientos de origen, 6 fueron positivos por cultivo y 8 por qPCR. Para la estimación de la sensibilidad y especificidad de la qPCR, se tomó como referencia de "animales enfermos" a los positivos por cultivo y aislamiento, y se obtuvo una sensibilidad del 100% (entre 92,9% y 100%). A su vez, se tomaron como referencia de "animales sanos" a los negativos por cultivo, obteniendo una especificidad del 99,4% (entre 98,3% y 100%) con un intervalo de confianza del 95% (Cuadro I).

Cuadro 1: Sensibilidad y especificidad de la real time PCR.

	qPCR	Cultivo		
		enfermo	sano	
positivo		7	2	9
negativo		0	306	306
		7	308	315

En el trabajo de Iraola et al. (2016) se estimó un 100% de sensibilidad y especificidad; esta diferencia con nuestros resultados puede deberse a que los ensayos se realizaron a partir de cepas aisladas tanto de *C. fetus* como de otras bacterias. A su vez, García Guerra et al. (2014) obtuvieron 85,4% de sensibilidad y 85% de especificidad también a partir de muestras de campo, pero utilizando una qPCR para detección de subespecie *C. fetus venerealis* (Hum et al. 1997). En el presente trabajo, el valor de concordancia kappa obtenido al comparar ambas técnicas diagnósticas fue de 0,87 con un error estándar de 0,09 y un intervalo de confianza de 95%. Cuando el valor de kappa es mayor o igual a 0,75 es considerado

una excelente concordancia (Landis y Koch, 1977), por lo tanto la qPCR puede ser utilizada como técnica de *screening*. Se obtuvo una proporción de toros portadores de *C. fetus* de 2,2 % por cultivo, y de 2,9% por qPCR, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los dos resultados, con un intervalo de confianza del 95%. Los resultados de la proporción de positivos de *C. fetus* por cultivo son similares a los antecedentes nacionales (Repiso et al., 2005) de 2,6%, por lo tanto no parece que la prevalencia del patógeno haya aumentado, a pesar de que se sigue demostrando su presencia en nuestro país. Se obtuvo un porcentaje de establecimientos con presencia de *C. fetus* de 9,7% por cultivo, y del 12,9% por qPCR, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los dos resultados, con un intervalo de confianza del 95%. A pesar de considerar la desventaja de tener bajo número de positivos, se observa una diferencia con respecto al 20,5% (estimado sobre la base de 47 aislamientos positivos) reportado por Repiso et al. (2005).

Conclusión

La qPCR utilizada es una técnica de *screening* adecuada para la detección de *C. fetus* directamente a partir de muestras de esmegma preputial de toros. Se sigue demostrando la presencia de *C. fetus* en nuestro país.

Bibliografía

- Abril C., Vilei, I. Brodard, A. Burnen, J. and R. Miserez. (2007). Discovery of insertion element ISCfe1: a new tool for *Campylobacter fetus* subspecies differentiation. Clin. Microbiol. Infect. 13:993-100.
- Boomsma A. (2005). Confidence Intervals for a Binomial Proportion. Department of Statistics & Measurement Theory. University of Groningen.
- García Guerra A, Chaban B, Colina JE, Waldner CL, Hendrick SH. (2014). Clinical sensitivity and specificity of a real-time PCR assay for *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* in preputial samples from bulls. Am J Vet Res;75:851-60.

- Hum S, Quinn K, Brunner J, On SLW. (1997). Evaluation of PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. *Aust. Vet. J.* 75:827-831.
- Iraola G, Pérez R, Betancor L, Marandino A, Morsella C, Méndez A, Paolicchi F, Piccirillo A, Tomás G, Velilla A, Calleros, L. (2016). A novel real-time PCR assay for quantitative detection of *Campylobacter fetus* based on ribosomal sequences. *BMC Veterinary Research*, 12, 286.
- Lander KP. (1990). The Development of a Transport and Enrichment Medium for *Campylobacter-Fetus*. *Br. Vet. J.* 146, 327-333.
- OIE (2017). Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres. Cap. 2.4.4. *Campilobacteriosis genital bovina*. <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-terrestre/acceso-en-linea>
- Repiso MV, Gil A, Bañales P, D'Anatro N, Fernandez L, Guarino H, Herrera B, Nuñez A, Olivera M, Osawa T, 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. *Veterinaria*. 40: 1-28.
- Schunck B, Kraft W, Truyen U. (1995). A simple touch-down polymerase chain reaction for the detection of canine parvovirus and feline panleukopenia virus in feces. *J. Virol. Methods* 55, 427-433.
- Thrusfield M. (1995). Diagnostic testing. En: Thrusfield M, editor. *Veterinary epidemiology*. 2th ed. Cambridge: Blackwell Science; p. 266-85.
- Van Bergen MAP, Linnane S, Van Putten JP, Wagenaar JA. (2005). Global detection and identification of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 24, 1017-1026.
- Van Der Graaf-Van Bloois L, Van Bergen MAP, Van Der Wal FJ, De Boer AG, Duim B, Schmidt T, Wagenaar JA. (2013). Evaluation of molecular assays for identification *Campylobacter fetus* species and subspecies and development of a *C. fetus* specific real-time PCR assay. *J. Microbiol. Methods*, 95, 93-97.
- Wilson EB. (1927). Probable inference, the law of succession, and statistical inference. *Journal of the American Statistical Association*. 22: 209-212.