



## INFECCION EXPERIMENTAL CON *Campylobacter Fetus* EN VAQUILLONAS Y TOROS: MONITOREO, DIAGNOSTICO Y EFICIENCIA REPRODUCTIVA

Morrell, EL; Cano, D; Morsella, C; Paolicchi, F; Campero, CM<sup>1</sup>

ccampero@balcarce.inta.gov.ar

<sup>1</sup>Grupo de Sanidad Animal, INTA. CC 276, (7620) Balcarce, Argentina

### RESUMEN

En el presente trabajo se infectaron experimentalmente por vía intravaginal 16 vaquillonas vírgenes de 18-20 meses de edad, raza A Angus y sus cruizas, con  $3 \times 10^8$  células viables de *Campylobacter fetus*. Las vaquillonas fueron divididas al azar en dos grupos (A y B) de 8 animales cada uno. Las vaquillonas de los grupos A y B se inocularon con *C. fetus* subespecie *venerealis* y *C. fetus* subespecie *fetus*, respectivamente. Inmediatamente post infección, las mismas fueron servidas durante 90 días con 2 toros también infectados por vía intraprepucial con *C. venerealis* y *C. fetus* cada uno, respectivamente. Se realizaron diagnósticos de preñez seriados mediante palpación rectal. Para evidenciar la infección se utilizaron la técnicas de inmunofluorescencia directa (IFD) e inmunofluorescencia directa con enriquecimiento previo (IDEP) en las muestras de esmegma prepucial y de mucus cervicovaginal (MCV), respectivamente mediante muestreos periódicos durante el servicio y hasta los 262 días posdesafío (DPD). El cultivo bacteriológico del MCV se pudo realizar solo en dos ocasiones. La totalidad de las vaquillonas se infectaron durante el ensayo. En ambos grupos se observaron hembras portadoras hasta los 262 DPD. Los toros también se infectaron aunque uno de ellos resultó negativo a los tests diagnósticos desde los 138 DPD hasta 262 DPD. El porcentaje final de preñez fue del 25% y 50% para los grupos A y B, respectivamente aunque las mismas no fueron significativas ( $P > 0.05$ ). No se encontraron diferencias ( $P > 0.05$ ) entre las técnicas empleadas para la identificación de las hembras infectadas. Se concluye que el presente modelo experimental releva una elevada susceptibilidad a la infección genital en vaquillonas vírgenes, un marcado efecto negativo de *C. fetus* sobre la gestación y una prolongada persistencia de infección genital.

### SUMMARY

Sixteen 18-20 months-old, Aberdeen Angus and crossbreed virgin heifers received by vaginal route an inoculum of  $3 \times 10^8$  cells of *Campylobacter fetus*. All heifers were randomly divided into two groups (A and B) with eight animals per group. Heifers of group A and B were inoculated with *Campylobacter fetus* subespecie *venerealis* and *Campylobacter fetus* subespecie *fetus*, respectively. Immediately post infection, breeding for 90 days was performed in all animals with two bulls experimental infected by intrapreputial route with *C. venerealis* and *C. fetus* each one. Pregnancy rate diagnosis were done by rectal examination. Identification of infection from preputial samples and cervico-vaginal mucus (CVM) by immunofluorescent antibody test and immunofluorescent antibody test with previous enrichment were done during the service until 262 days post challenged (DPC). Bacteriological cultures from CVM were only performed twice times. All heifers were infected during the assay. In both heifers groups, chronic genital infection were

observed until 262 DPC. Both bulls were infected but one of them was negative by diagnostic test from 138 (DPC) to 262 (DPC). The final pregnancy rate was 25% and 50% for the groups A and B heifers, respectively and did not differ significantly ( $P > 0.05$ ).

Methods using in this assay for *C. fetus* identification of infected heifers did not differ ( $P > 0.05$ ). High susceptibility, poor reproductive performance and persistence of infection in virgin heifers intravaginal challenged with *C. fetus* was noted in this experimental model.

### INTRODUCCION

La campylobacteriosis genital bovina es una enfermedad de transmisión venérea causada por *Campylobacter fetus* con las subespecies *venerealis* (incluido el biotipo intermedium) y *fetus* que provoca muerte embrionaria, abortos e infertilidad temporaria en las hembras siendo los toros portadores crónicos y asintomáticos de la enfermedad (Corbeil et al., 2003). Existen además hembras portadoras que pueden mantener la infección de un servicio a otro, reinfectando por medio del toro al resto del rodeo (Corbeil et al., 1981, Corbeil et al., 2003). En los rodeos de cría de Argentina, la prevalencia de la enfermedad continúa siendo elevada variando según zonas de 9.8% a 15.3% ocasionado severas pérdidas económicas (Campero, 2000). En el presente trabajo se propuso realizar un seguimiento diagnóstico de la enfermedad mediante el monitoreo del MCV y esmegma prepucial de bovinos experimentalmente infectados, determinar la persistencia de la infección y el impacto de la misma sobre la eficiencia reproductiva.

### MATERIALES Y METODOS

Animales, inoculación y servicio

En el presente ensayo se utilizaron vaquillonas vírgenes de 18-20 meses de edad raza Aberdeen Angus, con buena condición corporal y desarrollo genital, y dos toros Hereford de 2 y 5 años, respectivamente, clínicamente aptos y negativos a las pruebas serológicas diagnósticas para brucelosis. Los animales eran originarios de rodeos libres de brucelosis y enfermedades venéreas de las reservas ganaderas del Inta Balcarce, Argentina y permanecieron en pasturas artificiales con buena disponibilidad forrajera durante todo el ensayo. Tanto las vaquillonas como los dos toros fueron negativos a los muestreos previos mediante cultivo de los fluidos genitales para diagnóstico de Tricomonirosis (Campero et al., 1986) y por inmunofluorescencia para diagnóstico de Campylobacteriosis (Cipolla et al., 1995). Se utilizaron 16 vaquillonas en 2 grupos formados al azar de 8 animales cada uno (Grupos A y B). Las vaquillonas fueron desafiadas intravaginalmente con  $3.8 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias (UFC) de *C. venerealis* (Grupo A) y con  $3.5 \times 10^8$  UFC de *C. fetus fetus* (Grupo B) suspendidas en 1 ml de caldo brucella semisólido, respectivamente, utilizando para tal fin la pipeta de IA de Cassou, como ya fue descrito (Cobo et al., 2003). Al día siguiente post desafío, todas las hembras fueron a servicio natural con 2 toros durante 90 días. Las vaquillonas del grupo A fueron servidas con un toro de 5 años desafiado por vía intraprepucial con  $3.8 \times 10^8$  UFC de *C. venerealis* y las del grupo B con un toro de 2 años de edad desafiado con



3.5x10<sup>8</sup> UFC de *C. fetus fetus*. Para ambos toros, las cepas fueron suspendidas en 5 ml de caldo brucella semisólido, respectivamente. Los toros fueron a servicio con cada grupo de vaquillonas respectivo y no se juntaron en ningún momento. La cepas de *C. fetus* utilizadas para la inoculación experimental procedían del cepario existente en nuestro laboratorio de bacteriología, obtenidas a partir de casos naturales de infección en bovinos (*C. venerealis* cepa 97/608 aislada de un feto bovino abortado y *C fetus fetus* cepa C1 N3 aislada del mucus vaginal de vaca con infertilidad), ambas caracterizadas bioquímicamente y mantenidas a -196°C en nitrógeno líquido.

#### Muestreos, técnica de laboratorio y evaluación reproductiva.

Las muestras de MCV y esmegma prepucial fueron recolectadas con pipeta Cassou (Campero et al., 1993, Cobo et al., 2003). Los muestreos se realizaron a partir de los 15 DPD teniendo los primeros 4 muestreos un intervalo de 15 días, y los 7 muestreos posteriores un mes de intervalo hasta los 262 DPD, momento en que finalizó el ensayo. También se efectuó el diagnóstico de preñez por palpación rectal a los 78, 112 y 163 días post-servicio (DPS). El cultivo bacteriológico de los MCV se realizó solo en dos ocasiones a los 45 y 202 DPD, respectivamente.

El MCV recolectado se inoculó en el medio de transporte Cary Blair y posteriormente sembrado en caldo Brucella semisólido para su pre-enriquecimiento y posterior desarrollo de la técnica de IFD (Cipolla et al., 1995). Para el cultivo bacteriológico y partiendo del caldo pre-enriquecimiento previamente mencionado, se extrajo 0.5 ml y fue sembrado en Agar sangre Skirrow, el cual se mantuvo a 37°C durante 7 días con observaciones cada 48 hs de incubación, las colonias desarrolladas se identificaron como fue mencionado (Cipolla et al., 1995). En los toros se realizó IFD a partir del fluido prepucial sin previo enriquecimiento. En las técnicas de inmunofluorescencia se utilizó un conjugado específico anti-*C. fetus* desarrollado en conejo (Laboratorio Azul, Argentina).

## RESULTADOS

En el presente ensayo se infectaron todas las vaquillonas desafiadas aunque su detección por IDEP no fue constante para cada animal en los diferentes muestreos. En ninguno de los muestreos se observaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre los grupos A y B con respecto a la cantidad de vaquillonas positivas a la IDEP. En 4/11 muestreos realizados a los 90, 105, 202 y 222 DPD se observó una disminución del número de vaquillonas detectadas como infectadas. La performance reproductiva fue baja en ambos grupos a los 163 DPS (preñez del 25% grupo A y 50% grupo B, Tabla 1) aunque no difirió significativamente ( $P > 0.05$ ). Entre los 112 y 163 DPS se detectó mediante tacto rectal una pérdida de preñez (vaquillona N° 11, grupo A) aunque no se observó ni se encontró el feto abortado. No se observaron otros abortos ni eliminación de flujos genitales en ninguna de las hembras durante el ensayo. En ambos grupos, 4/8 hembras permanecieron infectadas hasta los 262 DPD. No se observaron diferencias significativas entre los dos cultivos de MCV y la IDEP a los 45 y 202 DPD (Tabla 2). Durante el servicio, ambos toros fueron positivos a la IFD al menos en un muestreo. Luego del servicio, el toro del grupo B resultó positivo a los 105 DPD aunque perma-

neció negativo hasta la finalización del ensayo. Mientras que el toro del grupo A fue positivo desde los 202 DPD hasta los 262 DPD. Del total de los 11 muestreos realizados, los toros de los grupos A y B se detectaron positivos en 4 y 2 oportunidades, respectivamente.

## DISCUSION

La elevada susceptibilidad de las vaquillonas vírgenes a la enfermedad observada en el presente trabajo es coincidente con lo reportado en otros trabajos (Corbeil et al., 1981). Los bajos índices de preñez obtenidos evidencian el severo efecto de *C. fetus* sobre la fertilidad de las vaquillonas. En este trabajo, es factible observar un efecto adicional en detrimento de la preñez dada la condición de infección experimental, tanto de las vaquillonas como de los toros. Es factible que en condiciones de infección natural de la enfermedad a campo y en un servicio estacionado de 90 días, los porcentajes de preñez resulten algo más elevados que los aquí observados. Pese a ello, informes previos evidenciaron severas bajas de preñez en algunos casos de infertilidad de rodeos para carne por Campylobacteriosis (Campero et al., 1996, Campero, 2002, Echevarría et al., 2001). Si bien por tacto rectal se detectó un aborto de aproximadamente 5 meses de gestación, al efectuar el diagnóstico gestacional entre los 112 y 163 DPD, hubiera sido necesario aplicar técnicas ecográficas y un monitoreo más frecuente para una mejor caracterización de las pérdidas de preñez en los 3 primeros meses de la gestación. La persistencia de infección genital en vaquillonas por IDEP hasta los 262 DPD en ambos grupos, resalta el rol de las hembras portadoras de la enfermedad y sus implicancias epidemiológicas en el mantenimiento de la misma en el rodeo (Campero, 2002, Cipolla et al., 1994). La circunstancia de que los toros detectados positivos en un bajo número de muestreos durante el servicio, sugiere la baja sensibilidad del método de IFD, reforzando la necesidad de la repetitividad de los muestreos antes de declarar a un toro como negativo, como ya fue previamente mencionado (Campero, 2002). A su vez, la disminución de la sensibilidad de la técnica de IFD pudo deberse a las montas repetidas que ocurren durante este período (Campero, 2002). Trabajos previos demuestran que la infección crónica es más frecuente en toros adultos que en los jóvenes. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el presente ensayo. Se concluye que el presente modelo experimental de infección puede ser de utilidad para futuros trabajos de evaluación vacunal. Surge también como relevante la cronicidad de la infección genital en las vaquillonas (hasta 262 DPD) y la importancia de contar con cepas patógenas obtenidas de brotes de campo y mantenidas en adecuadas condiciones, a los fines de no alterar su composición antigénica y mantener su patogenicidad.

## REFERENCIAS

- CAMPERO, CM; CATENA, MC; MEDINA, D Caldo infusión hígado para el cultivo de *Trichomonas foetus*. Vet. Arg. 3: 80-81. 1986.
- CAMPERO, CM; PATITUCCI, A; MEDINA, D. Tricomoniasis bovina: Infección experimental y natural en hembras. Vet. Arg. 10: 662-670. 1993.
- CAMPERO CM; ODRIÓZOLA E; CASARO A; CHAYER



R; ODEON A. Evaluación de las pérdidas reproductivas en rodeos de cría desde la gestación al parto. Abstracts PN13 330: 400. XV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias, Campo Grande, Brasil, 21 al 25 de octubre de 1996.

CAMPERO, CM. Las enfermedades reproductivas de los bovinos: ayer y hoy. Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria, Anales 53: 88-112. 2000.

CAMPERO, CM. Eficiencia productiva del rodeo de cría. Rev. Idia XXI 2: 127-131.2002.

CIPOLLA A, CASARO A, TERZOLO H, ESTELA E, BROOKS B and GARCIA M. Persistence of *Campylobacter fetus* subspecies venerealis in experimentally infected heifers. Vet. Rec. 134:628.1994.

CIPOLLA A, CAMPERO CM, MEDINA D, MORSELLA C, COSENTINO B, CARACINO M, MARCONE J and SPATH E. Un método mejorado para el diagnóstico de la campylobacteriosis genital en vacas. XIV Annual Meeting A.L.P.A, p742. 1995.

COBO ER, CIPOLLA AL, MORSELLA C, CANO D, CAMPERO CM. Effect of two commercial vaccines to *Campylobacter fetus* subspecies on heifers naturally challenged. J. Vet. Med. B 50: 75-80. 2003.

CORBEIL LB, SCHURIG J, DUNCAN B, WILKIE, WINTER A. Immunity in the female bovine reproductive tract based on the response to *Campylobacter fetus*. Adv. Exp. Med. Biol. 137: 729-743. 1981.

CORBEIL LB, CAMPERO CM, RHYAN JC, BONDURANT RH. Vaccines against sexually transmitted diseases. Reprod. Biol. Endoc. 1:118. 2003.

ECHEVARRIA S, CIPOLLA A, ALLER J, COBO E, MORSELLA C, CANO D, VERNA A, ZAPIOLA A, CAMPERO C. Una alternativa de manejo sanitario en hembras bovinas vacías con infección persistente a *Campylobacter fetus*. 4º Simposio Internacional de Reproducción Animal. 22 al 24 de junio de 2001. Carlos Paz, Córdoba, Argentina.

Tabla 1. Vaquillonas positivas en el MCV a *C. fetus* mediante IDEP y performance reproductiva

Grupo	Muestreos según días post-desafío											Preñez*	
	Servicio												**
	15	30	45	60	90	105	138	168	202	222	262		
A	5/8	4/8	6/8	7/8	2/8	2/8	6/8	4/8	3/8	0/8	4/8	2/8	
B	6/8	7/8	7/8	4/8	3/8	2/8	4/8	4/8	2/8	2/8	4/8	4/8	

\*Evaluación final a los 262 días post servicio,

\*\*Diagnósticos gestacionales por tacto rectal

Tabla 2. Resultados por cultivo bacteriológico e IDEP en el MCV a los 45 y 202 DPD

Grupo	45 DPD		202 DPD	
	Cultivo	IDEP	Cultivo	IDEP
A (n= 8)	6/8	6/8	1/8	3/8
B (n= 8)	6/8	7/8	2/8	2/8