

## CAMPILOBACTERIOSIS GENITAL BOVINA

---

### RESUMEN

**Descripción de la enfermedad:** La campilobacteriosis genital bovina (CGB) es una enfermedad venérea. El agente causal de esta enfermedad de transmisión sexual es *Campylobacter fetus* subespecie *venerealis*, una de las tres causas de infertilidad, muerte embrionaria temprana y aborto con pérdidas económicas considerables. Las infecciones bovinas por *C. fetus* subesp. *fetus* se asocian con el aborto y ocurren de forma más esporádica.

*C. fetus* subesp. *venerealis*, tiene un tropismo acentuado por el sistema genital del ganado bovino, tanto masculino como femenino. La transmisión bacteriana se produce sobre todo durante la monta natural, pero también puede transmitirse a través de la inseminación artificial con semen de toros infectados.

**Identificación del agente:** Se pueden analizar las muestras tomadas de toros, vacas o fetos abortados para averiguar si está presente el agente causal. El organismo tiene forma de bacilo delgado, curvado y Gram negativo que puede tener una configuración en forma de S, de silueta como la de la gaviota durante el vuelo y de espiral, y puede cultivarse en medios selectivos a 37°C durante al menos 2 días en microaerobiosis. La confirmación del aislamiento y la distinción entre las subespecies de *C. fetus* se puede llevar a cabo mediante procedimientos bioquímicos o moleculares, aunque en este último caso se precisará una prueba que ofrezca la suficiente especificidad. También se puede utilizar la inmunofluorescencia, pero esa prueba no sirve para diferenciar subespecies.

Para detectar *C. fetus* a partir del medio de transporte y enriquecimiento de Clarke también puede utilizarse un ensayo de inmunoenzimología (ELISA) de captura con anticuerpos monoclonales. Como ocurre con la inmunofluorescencia, el ELISA no permite diferenciar bien entre las dos subespecies de *C. fetus*, de tal forma que se reduce a un método de cribado que se puede aplicar tras los métodos de cultivo clásicos, y que sirve para confirmar la identificación de los resultados del ELISA positivos. No obstante, en comparación con la inmunofluorescencia, tiene la ventaja de ofrecer una sensibilidad y una especificidad más altas para la identificación de *C. fetus* y un rendimiento mucho mayor tanto en lo que respecta a los resultados negativos como a los positivos cuando se analiza un volumen de muestras mayor.

**Pruebas serológicas:** El ELISA puede utilizarse para comprobar la inmunidad del rebaño, pero no es adecuado para el diagnóstico de la infección en los animales individuales. Mediante esta prueba no se puede diferenciar entre las infecciones causadas por las dos subespecies: *C. fetus* subesp. *venerealis* y *C. fetus* subesp. *fetus*.

**Requisitos para las vacunas:** Puede prepararse vacuna con *C. fetus* subesp. *venerealis* o con *C. fetus* subesp. *fetus*, puesto que ambas subespecies parecen tener en común antígenos protectores. Esta vacuna se inactiva con formalina y se puede administrar con una emulsión oleosa como adyuvante.

### A. INTRODUCCIÓN

#### 1. Descripción e impacto de la enfermedad

La campilobacteriosis genital bovina (CGB, también conocida como campilobacteriosis venérea bovina [CVB]), es una enfermedad caracterizada por infertilidad, muerte precoz del embrión y abortos en el ganado bovino. El

agente causal de esta enfermedad de transmisión sexual es *Campylobacter fetus* subesp. *venerealis* (Cfv). Puede aislarse del tracto genital del ganado bovino (p. ej., de esmegma prepucial o mucus vaginal) o de los órganos internos de los fetos abortados y causa problemas de fertilidad acompañados de considerables pérdidas económicas. Cff puede recuperarse del tracto intestinal del ganado bovino y de otras especies de animales (García *et al.*, 1983); se puede aislar a partir de los fetos bovinos abortados, lo cual indica su importancia clínica en el ganado bovino. Cff se asocia a casos esporádicos de aborto en los bovinos, mientras que Cfv se asocia al aborto endémico y a problemas de fertilidad en ciertas zonas geográficas.

Aunque a *C. fetus* se le reconoce sobre todo como agente patógeno de los animales, Cff a veces se diagnostica de forma ocasional como agente patógeno oportunista en el hombre. Las infecciones ocurren normalmente en las hembras preñadas o animales inmunodeprimidos, y a menudo son sistémicas y van acompañadas de complicaciones, en función del lugar de infección (Wagenaar *et al.*, 2014). Las manipulaciones de laboratorio deben llevarse a cabo aplicando las medidas de bioseguridad y contención adecuadas, que vendrán determinadas por un análisis del riesgo biológico (véase el Capítulo 1.1.4 *Bioseguridad y bioprotección: Normas para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones para los animales*).

## 2. Taxonomía

*Campylobacter fetus* es una de las 27 especies actualmente conocidas del género *Campylobacter* (<http://www.bacterio.cict.fr/c/campylobacter.html>). Se han identificado tres subespecies de *C. fetus*: *C. fetus* subesp. *testudinum* (Cft), *C. fetus* subesp. *fetus* (Cff) y *C. fetus* subesp. *venerealis* (Cfv), de las cuales Cft se asocia a reptiles y tanto Cff como Cfv se asocian a mamíferos. Aunque los signos clínicos relacionados con infecciones por Cfv y Cff se solapan, originalmente se definieron en función de las diferencias en sus presentaciones clínicas respectivas (Florent, 1959; Veron & Chatelain, 1973). Cfv y Cff se pueden diferenciar por su tolerancia a la prueba del 1% de glicina y por la producción de H<sub>2</sub>S en medio enriquecido con cisteína; Cfv no puede crecer en presencia de un 1% de glicina y no produce H<sub>2</sub>S en un medio enriquecido con cisteína, mientras que Cff sí es tolerante al 1% de glicina y sí produce H<sub>2</sub>S (Florent, 1959; Veron & Chatelain, 1973). Cfv incluye una variante denominada Cfv biovar *intermedius* (Florent, 1959; Veron & Chatelain, 1973). Ni la hibridación ADN-ADN (Harvey & Greenwood, 1983) ni los patrones de bandas de proteínas obtenidos con la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) de proteínas de células enteras (Vandamme *et al.*, 1990) revelaron diferencias importantes entre Cfv y Cff. Se puede emplear la MALDI-TOF (ionización/desorción mediante láser asistida por matriz – tiempo de vuelo) para identificar *C. fetus* a nivel de especie (Bessede *et al.*, 2011), pero esta prueba no permite diferenciar entre Cff y Cfv. De todas las pruebas moleculares descritas, solo las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) que tienen por objetivo el gen *nahE*, tanto convencionales como en tiempo real, permiten identificar *C. fetus* de forma fiable (Abril *et al.*, 2007; van der Graaf-van Bloois *et al.*, 2013), además de la tipificación multilocus de secuencias (MLST) y del análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP) (van Bergen *et al.*, 2005a; Wagenaar *et al.*, 2001). Se han descrito varios métodos moleculares que se dice que permiten diferenciar entre Cff y Cfv, como PCR (Abril *et al.*, 2007; Hum *et al.*, 1997; Tu *et al.*, 2005; van Bergen *et al.*, 2005c; Wang *et al.*, 2002), electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) (On & Harrington, 2001), MLST (van Bergen *et al.*, 2005a) o AFLP (Wagenaar *et al.*, 2001) (véase también el Apartado B.1.9), pero ninguna de estas pruebas moleculares permite identificar las cepas de *C. fetus* a nivel de subespecie de forma fiable ((Iraola *et al.*, 2015; van der Graaf-van Bloois *et al.*, 2013). La PCR descrita por McGoldrick *et al.* (2013) para la identificación de *C. fetus venerealis* presentó una sensibilidad del 98,7% y una especificidad del 99,8%. Se puede emplear una secuenciación del genoma completo para diferenciar entre cepas de *C. fetus* de mamífero en función de la parte principal del genoma (van der Graaf-van Bloois *et al.*, 2014), pero este método no concuerda del todo con la identificación fenotípica de las subespecies de las cepas de *C. fetus*.

El cultivo e identificación del microorganismo es un sistema adecuado para certificar animales concretos antes de los desplazamientos. Sin embargo, los métodos de cultivo clásicos pueden requerir tiempo. El sistema de cribado mediante enzimoimmunoanálisis (ELISA) de captura con anticuerpos monoclonales (MAb), que es sensible y específico y está validado (Brooks *et al.*, 2004; Devenish *et al.*, 2005), permite detectar con exactitud subespecies de *C. fetus* a partir del medio de transporte y enriquecimiento (MTE) de Clarke incubado. Para la confirmación de subespecies específicas solo se someten a cultivo las muestras cuyo resultado de ELISA ha sido positivo, empleando métodos estándar de aislamiento e identificación. Este procedimiento tiene la ventaja de que los resultados se obtienen en un menor periodo de tiempo y de que resulta más fácil de ejecutar que los métodos de cultivo clásicos.

## B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

**Tabla 1.** Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la campilobacteriosis genital bovina y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
<b>Identificación del agente<sup>1</sup></b>						
Cultivo (incluida la caracterización fenotípica)	+++	+++	+++	+++	+++	–
IFAT	++	++	++	++	++	–
ELISA con MAb	++	++	++	++	++	–
MALDI-TOF	+	+	+	+	+	–
MLST	+	+	+	+	+	–
PCR para <i>C. fetus</i> ( <i>nahE</i> )	++	++	++	++	++	–
<b>Detección de respuesta inmunitaria</b>						
ELISA para detección de anticuerpos	–	–	–	–	–	+

Clave: +++ = método recomendado, validado para este propósito; ++ = método idóneo pero que puede precisar una posterior validación; + = puede utilizarse en algunas situaciones, pero el coste, la fiabilidad y otros factores limitan mucho su aplicación; – = no adecuado para este propósito; n/a = no aplicable.

IFAT = prueba de la inmunofluorescencia indirecta; MAb = anticuerpo monoclonal; ELISA = enzimoimmunoanálisis; Maldit-of = desorción/ionización con láser asistida por matriz – tiempo de vuelo; MLST = tipificación multilocus de secuencias; PCR = reacción en cadena de la polimerasa

### 1. Aislamiento e identificación del agente

#### 1.1. Obtención de muestras

##### 1.1.1. En el macho: esmegma prepucial y semen

En los toros, el esmegma puede obtenerse por diferentes métodos: raspado (Tedesco *et al.*, 1977), aspiración (Campero *et al.*, 2003) y lavado (Clarke & Dufty, 1978). Normalmente el esmegma se obtiene mediante raspado y puede utilizarse para el aislamiento del microorganismo o puede aclararse en un tubo con unos 5 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenga un 1% de formalina para el diagnóstico mediante la prueba de la inmunofluorescencia. El esmegma también puede tomarse en una vagina artificial después de la toma del semen, lavando la vagina artificial con 20–30 ml de PBS.

Para los lavados prepuciales, se introducen en el saco prepucial 20–30 ml de PBS. Después de un masaje vigoroso de 15–20 segundos, se recoge el líquido.

<sup>1</sup> Se recomienda aplicar una combinación de métodos de identificación del agente a una misma muestra clínica.

El semen se recoge en condiciones tan asépticas como sea posible. Las muestras de semen deben diluirse con PBS e inocularse directamente en medio de cultivo o en medio de transporte y enriquecimiento.

#### 1.1.2. En la hembra: mucus cervicovaginal

Las muestras pueden obtenerse por aspiración o por lavado de la cavidad vaginal.

Para la aspiración, se limpia la zona de la vulva y se introduce en la cavidad vaginal una pipeta de inseminación artificial o una pipeta de Cassou (vaina azul), de forma que la parte anterior alcance el cuello uterino (Campero *et al.*, 2003). Se succiona suavemente mientras se mueve la pipeta hacia delante y hacia atrás. Se retira la pipeta y el mucus recogido se inocula directamente en un medio de cultivo o en un medio de transporte y enriquecimiento.

El MCV también puede recogerse mediante el lavado de la cavidad vaginal: se introducen en la cavidad 20–30 ml de PBS con una jeringuilla unida a una pipeta de inseminación artificial. El líquido se aspira y se reintroduce en la cavidad cuatro o cinco veces antes de recogerlo y extenderlo directamente en medio de cultivo o de añadirlo a un medio de transporte y enriquecimiento. También se puede recoger líquido a partir del lavado de la cavidad vaginal con un tampón o gasa estéril mantenidos en la vagina durante 5–10 minutos después de introducir PBS. Las muestras de MCV obtenidas por succión pueden diluirse con PBS, o sembrarse directamente en un medio de cultivo o de transporte y enriquecimiento.

#### 1.1.3. Fetos abortados, placentas

Las mejores muestras para el aislamiento de estas bacterias son la placenta, el contenido estomacal, los pulmones y el hígado del feto. Las muestras se obtienen de forma aséptica y se inoculan en un medio de transporte y enriquecimiento, o en PBS con un 1% de formalina para llevar a cabo la inmunofluorescencia indirecta (IFA).

### 1.2. Transporte de muestras

El uso de medio de transporte es esencial si las muestras no se van a procesar en el laboratorio el mismo día de su obtención. Para su envío al laboratorio, las muestras deben colocarse en un recipiente hermético (a una temperatura de entre 4 y 8 °C), y deben protegerse de la luz y enviarse de tal forma que lleguen al laboratorio cuanto antes, de preferencia el mismo día que se hayan obtenido.

Se dispone de varios medio de transporte y enriquecimiento, como el de Clark, Lander, SBL, Foley y Clark, Weybridge y Cary-Blair (García *et al.*, 1984; Hum *et al.*, 1994; Monke *et al.*, 2002).

Algunos de los medios de transporte y enriquecimiento antes mencionados contienen cicloheximida. Debido a su posible toxicidad, puede usarse amfotericina B como alternativa.

### 1.3. Tratamiento de muestras

Cuando las muestras lleguen al laboratorio, deben inocularse directamente en un medio de cultivo o procesarse de inmediato si así se requiere.

#### 1.3.1. Muestras del tracto genital

El lavado prepucial se puede centrifugar (3.500 **g**) para concentrar la muestra. La muestra final (reducida a 250 µl) puede inocularse en medio de cultivo (directamente y/o utilizando el método de filtro).

Si el MCV no es muy viscoso puede inocularse directamente o licuarse con un volumen igual de PBS. Cuando el MCV es muy viscoso, puede ser necesario licuarlo añadiendo un volumen igual de solución de L-cisteína (*N*-Acetil-L-cisteína 100 mM, número CAS 616-91-1<sup>2</sup>, disuelta en PBS y esterilizada mediante filtración por membrana). A los 15–20 minutos, el mucus diluido y licuado puede inocularse en el medio de aislamiento.

Para el método del filtro: se colocan membranas de acetato de celulosa estériles de un tamaño de poro de 0,45–0,65 µm sobre la superficie de un agar no selectivo suplementado con un 5% de sangre. Se lleva a cabo una suspensión de la muestra en PBS o solución salina, y se instilan 10–15 gotas de esta suspensión en la parte superior de la membrana y se dejan filtrar

---

2 Este es el número correspondiente a esta sustancia química, asignado por el *Chemical Abstracts Service* (CAS).

de forma pasiva a 37°C (no se precisan condiciones de microaerobiosis). Pasados 30–40 minutos, las membranas de filtro se retiran y las placas de cultivo se incuban 1–2 días a 37°C en condiciones de microaerobiosis (Steele *et al.*, 1984).

### 1.3.2. Fetos abortados, placentas

El contenido del estómago fetal se inocula directamente en un medio de cultivo adecuado. Los órganos internos, o trozos de órganos, se flamean para esterilizar la superficie, y luego se homogeneizan. El homogenado se inocula en medio de cultivo.

Después de lavar las membranas placentarias con PBS estéril para eliminar la mayor parte de la contaminación superficial, se raspan las vellosidades coriónicas y el raspado se transfiere a un medio de cultivo.

## 1.4. Aislamiento de *Campylobacter fetus*

### 1.4.1. Medios de cultivo para el aislamiento

Actualmente hay muchos medios en uso para el diagnóstico bacteriológico de la CGB. Debería tenerse en cuenta que varios medios utilizados para el aislamiento de *Campylobacter spp.* no son adecuados para el aislamiento de *C. fetus* debido a los antimicrobianos (p. ej.: las cefalosporinas) que pueden inhibir el crecimiento de *C. fetus* (van Bergen *et al.*, 2005b). La mayoría de los medios de cultivo contienen cicloheximida. Debido a su posible toxicidad, este antifúngico puede sustituirse por anfotericina B. Como medio selectivo de aislamiento de *C. fetus* se recomienda el de Skirrow. Se trata de un medio basado en sangre con un 5–7% de sangre (lisada) desfibrinada y contiene los siguientes agentes selectivos: sulfato de polimixina B (2,5 UI/ml), trimetoprim (5 µg/ml), vancomicina (10 µg/ml) y cicloheximida (50 µg/ml).

De forma alternativa se puede utilizar un medio no selectivo basado en sangre (5–7%) en combinación con la filtración (0,65 µm); no obstante, puede ser menos sensible que el medio selectivo.

Debería llevarse a cabo un control de calidad de cada lote de medios utilizando cepas de control.

### 1.4.2. Condiciones de incubación

Las placas se incuban a 37°C y en una atmósfera microaerobia con un 5–10% de oxígeno, un 5–10% de dióxido de carbono y preferiblemente un 5–9% de hidrógeno para un crecimiento óptimo (Vandamme, 2000). Las condiciones microaerobias pueden establecerse mediante varios métodos. En algunos laboratorios se crea una atmósfera adecuada sustituyendo gas en una jarra. Existen kits a la venta para la generación del gas. También se pueden utilizar incubadoras de atmósfera variable.

Las condiciones de cultivo e incubación se verifican de forma sistemática utilizando cepas control de *C. fetus* subesp. *fetus* y *C. fetus* subesp. *venerealis*. Deben utilizarse esos controles cada vez que se intente llevar a cabo un aislamiento.

## 1.5. Identificación de especies de *Campylobacter*

### 1.5.1. Morfología de la colonia

Normalmente las colonias de *C. fetus* aparecen después de 2–5 días en los medios de cultivo. Para evitar que el crecimiento de los contaminantes se superponga a las colonias específicas, se recomienda evaluar diariamente los medios y subcultivar las colonias sospechosas. Después de 3–5 días de incubación, las colonias miden 1–3 mm de diámetro. Son ligeramente rosas-grisáceas, redondas, convexas, lisas y brillantes y con un borde regular.

### 1.5.2. Morfología macroscópica

*Campylobacter* es móvil, aunque esta propiedad puede desaparecer después de los subcultivos. A menudo *Campylobacter* presenta la forma de un bacilo curvado fino, de 0,3–0,4 µm de ancho y 0,5–8,0 µm de largo. En vivo se pueden observar simultáneamente formas cortas (en forma de coma), medias (en forma de S) y largas (helicoidales con varias espirales). Los cultivos viejos pueden contener formas cocoides.

### 1.5.3. Pruebas bioquímicas

Véase la Tabla 2.

### 1.5.4. Atmósfera

*Campylobacter fetus* no crece en condiciones aerobias.

## 1.6. Identificación inmunológica de *Campylobacter fetus*

La IFAT puede aplicarse para la identificación del microorganismo de forma directa a partir de muestras o para confirmar la identificación de una cepa después del aislamiento. Esta prueba no permite diferenciar entre subespecies.

### 1.6.1. Preparación de sueros inmunes

Se cultivan cepas de *Campylobacter*, preferiblemente cepas estándar de colecciones de cultivo reconocidas (*C. fetus* subesp. *venerealis* o *C. fetus* subesp. *fetus*), durante 3 días a 37°C en medio que contenga sangre y en condiciones microaerobias. Los microorganismos se recogen en PBS, y se lavan dos veces mediante centrifugación. Se inoculan intramuscularmente conejos de 3 meses con 2 ml de una suspensión de 10<sup>11</sup> microorganismos/ml de una subespecie de *C. fetus* en PBS y adyuvante incompleto de Freund. Los inóculos se administran en cuatro puntos, con 0,5 ml en cada uno. Los animales se sangran antes de la inoculación y después a intervalos semanales. Cuando los títulos del suero son elevados en las pruebas de inmunofluorescencia o de aglutinación, se inoculan por vía intravenosa 0,1–1,0 ml con 10<sup>10</sup> microorganismos viables/ml. Los conejos se sangran 7 días después para obtener suero y se juntan todos los sueros. En un estudio reciente, se ha descrito un conjugado preparado de IgY de pollo como alternativa a los anticuerpos de conejo. Se han descrito anticuerpos monoclonales que pueden utilizarse para la detección inmunodiagnóstica de *C. fetus* (Brooks *et al.*, 2002).

### 1.6.2. Preparación de conjugados

Los conjugados se preparan según la descripción de Harlow y Lane (1988). La solución de trabajo del conjugado se determina por una titulación de doble entrada frente a frotis de un cultivo de *C. fetus* utilizando diluciones control positivas y negativas, y seleccionando dos veces la concentración más baja que produzca una fluorescencia brillante con las bacterias *C. fetus*.

### 1.6.3. Preparación de la muestra

Se aclaran las muestras de líquido genital (contenido del abomaso fetal, esmegma prepucial o MCV) en unos 5 ml de PBS con un 1% de formalina. Se realizan dos pasos de centrifugación. En primer lugar, se centrifugan las muestras a 600 **g** durante 10 minutos a 4°C para separar los desechos. A continuación, se centrifuga el sobrenadante a 8.000 **g** durante 30 minutos a 4°C. Se disuelve el precipitado en unos 100 µl del sobrenadante restante.

### 1.6.4. Prueba de la inmunofluorescencia (Mellick *et al.*, 1965)

Se aplica dos veces la muestra (20 µl) a los portas del microscopio. El material se seca al aire y se fija con acetona a –20°C durante 30 minutos o con etanol a 18–25°C durante 30 minutos. Se secan al aire los portas de vidrio y se añade, a una dilución adecuada, el antisuero conjugado con isocianato de fluoresceína isómero (FITC). La tinción se realiza en una cámara húmeda a 37°C durante 30 minutos y a oscuras. A continuación, se lavan los portas tres veces con PBS durante tres minutos. Se montan los portas en glicerol tamponado (90% de glicerol: 10% de PBS). Se sellan los cubreobjetos para impedir su desecación, y se examinan los portas con luz ultravioleta en un microscopio de fluorescencia. Se utilizarán portas de control positivos y negativos cada vez que se realice la prueba. Las cepas de referencia de *Campylobacter fetus* subesp. *venerealis* y *C. fetus* subesp. *fetus* se usan como controles positivos y otras especie de *Campylobacter* se usan como control negativo. La muestra que presenta bacterias fluorescentes con la morfología típica de *C. fetus* se considera positiva.

### 1.7. Identificación bioquímica de subespecies de *Campylobacter fetus*

Las pruebas descritas en la Tabla 2 deben realizarse sobre cultivos puros.

**Tabla 2.** Características diferenciales de varias especies de *Campylobacter* que pueden aislarse del tracto genital bovino y de fetos bovinos abortados (según *Bergey's Manual*, 2ª edición, 2005)

	25°C	42°C	Oxidasa	Catalasa	NaCl 3,5%	Glicina 1%	H <sub>2</sub> S cisteína
<i>C. fetus</i> subesp. <i>venerealis</i>	V	- V <sup>(a)</sup>	+	V	-	-	-
<i>C. fetus</i> subesp. <i>fetus</i>	V	V <sup>(a)</sup>	+	+	-	+	+
<i>C. jejuni</i>	-	V <sup>(b)</sup>	+	V <sup>(c)</sup>	-	V	+
<i>C. hyointestinalis</i>	-	+	+	+	-	V	n.d.
<i>C. sputorum</i>	-	+	+	V	+	+	n.d.

(a) = Aunque *C. fetus* no es una especie termófila de *Campylobacter*, se ha descrito el crecimiento de esta especie a 42°C;

(b) *C. jejuni* subesp. *jejuni* es positivo, *C. jejuni* subesp. *doylei* es negativo;

(c) *C. jejuni* subesp. *jejuni* es positivo, *C. jejuni* subesp. *doylei* es variable;

(+) = reacción o crecimiento positivo y (-) = reacción negativa o ausencia de crecimiento de la cepa en un medio adecuado bajo condiciones especificadas (véase el Apartado B.1.4); V = resultados variables; n.d. = indeterminado.

#### 1.7.1. Crecimiento a 25°C y 42°C

Se inocula una suspensión de células (McFarland n° 1) en placas que contengan medio de cultivo con sangre. Se incuba cada placa en las condiciones atmosféricas especificadas (véase el Apartado B.1.4.2) a 25°C y 42°C. Se analizan en paralelo las cepas control.

#### 1.7.2. Oxidasa y catalasa

Las pruebas se realizan siguiendo el protocolo bacteriológico estándar. Se analizan en paralelo las cepas control.

#### 1.7.3. Crecimiento en presencia de cloruro sódico

Se inocula una suspensión de células en medio con sangre que contenga NaCl al 3,5% (15 ml de medio con sangre + 2,04 ml de solución de cloruro sódico 5 M), y luego se añade a un medio que contenga solo sangre. Se realiza la incubación en las condiciones atmosféricas especificadas (véase el Apartado B.1.4.2). Se analizan en paralelo las cepas control.

#### 1.7.4. Crecimiento en presencia de un 1% de glicina

Se inocula una suspensión de células (McFarland n° 1) en medio de cultivo (15 ml de medio con sangre + 1,65 ml de solución acuosa de glicina al 10% esterilizada con filtro), y luego se inocula en el mismo medio, pero sin glicina. La incubación se realiza en las condiciones atmosféricas especificadas (véase el Apartado B.1.4.2). Se analizan en paralelo dos cepas control (Cff y Cfv). Como las cepas son exigentes en cuanto al cultivo, puede ser significativa la aparición de pequeños cambios en los medios, y la ausencia de crecimiento en presencia de glicina debe considerarse como un indicio preliminar de que se trata de *C. fetus* subesp. *venerealis*. La reproducibilidad de la prueba es baja y se han descrito cepas intermedias (Salama *et al.*, 1992 y Van Bergen *et al.*, 2005a). Asimismo, la fiabilidad de la prueba de la tolerancia al 1 % de glicina puede estar influenciada por el hecho de que la tolerancia a la glicina puede ser transducida por fagos (Chang & Ogg, 1971).

#### 1.7.5. Producción de ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S)

La prueba del sulfhídrico se realiza en un medio líquido de *Brucella* que contenga un 0,02% cisteína. Se inocula al medio una suspensión celular (~McFarland N° 1). La producción de H<sub>2</sub>S se detecta mediante una tira de acetato de plomo incrustada dentro de la parte superior del tubo durante 72 horas. El ennegrecimiento de la tira de acetato de plomo se considera como reacción positiva. Se analizan en paralelo las cepas control.

## 1.8. ELISA de captura con anticuerpos monoclonales

El ELISA de captura con MAb puede emplearse para detectar la presencia de *C. fetus* en el MTE Clarke. El procedimiento y los reactivos validados se describen en Brooks *et al.* (2004) y Devenish *et al.* (2005). En resumen, las muestras (lavados prepuciales, mucus vaginal, líquidos fetales, tejidos placentarios y tejido hepático) se ponen en un MTE Clarke y se incuban 4-5 días. Se extrae alrededor de 1,5 ml de líquido del MTE, se calienta y se analiza mediante ELISA. Se utiliza un antisuero policlonal de conejo (frente a seis cepas distintas de *C. fetus* subesp. *fetus* y *C. fetus* subesp. *venerealis* de los serotipos A y B) para capturar antígeno del líquido del MTE. La detección de los posibles antígenos capturados se logra mediante una prueba posterior en la que se emplean MAb de ratón específicos de los epítomos de lipopolisacárido (LPS); el LPS central de *C. fetus* subesp. (1 MAb: M1825), el LPS de cadena lateral específico del serotipo A (2 MABs: M1177 y M1194) y el LPS de cadena lateral específico del serotipo B (1 MAb: M1183). Se ha comprobado que esta prueba tiene una sensibilidad del 100% y una especificidad del 99,5% en la detección de *C. fetus* en líquidos de MTE, y que permite analizar una gran cantidad de muestras al mismo tiempo.

### 1.8.1. Procedimiento analítico

- i) *Fase sólida:* Se recubren los pocillos de las placas de ELISA con una dilución óptima de un suero con anticuerpos policlonales contra la subespecie de *C. fetus* generados en conejo (en tampón carbonato 0,06 M, pH 9,6) y se incuban la placa 18 horas a temperatura ambiente (TA). Las placas de ELISA recubiertas pueden sellarse y conservarse a -20°C durante 1 mes. Antes del análisis, las placas de ELISA, a TA, se lavan cuatro veces empleando PBS 0,01 M que contenga NaCl 0,15 M y Tween 20 al 0,05% (PBST).
- ii) *Controles:* Existen tres antígenos control: 1) *C. fetus* subesp. *fetus* (ATCC 27374), un control positivo fuerte de serotipo B que se une al MAb central LPS (M1825) y al único MAb específico de serotipo B (M1183); 2) *C. fetus* subesp. *venerealis* (ATCC 19438), un control positivo débil de serotipo A que se une al MAb central LPS (M1825) y a los dos MAB específicos de serotipo A (M1177 y M1194); y 3) *C. sputorum* biovar *sputorum*, un control negativo que no se une a ninguno de los cuatro MAB. Se cultivan, lavan, concentran y conservan a -20°C los lotes de los tres antígenos control.
- iii) *Muestras problema:* Tras una incubación de 4-5 días a 37°C de las muestras del MTE inoculado, se extraen alrededor de 1,5 ml de líquido de los viales del MTE. Se calientan a 100°C durante 15 minutos antígenos control a la dilución óptima y muestras de líquido del MTE sin diluir, y se enfrían hasta TA. Cada muestra de líquido problema calentada se añade por duplicado y cada antígeno control calentado se inocula por cuadruplicado a los pocillos correspondientes de la placa de ELISA en fase sólida, que se incuban durante 1 hora a TA.
- iv) *Detector:* Para ahorrar reactivos, el cribado de los líquidos se realiza inicialmente con el MAb central M1825. Se añade MAb M1825 diluido (idealmente en PBST) a cada pocillo de las placas de ELISA y las placas se incuban 1 hora a TA. Los líquidos que den un resultado positivo al utilizar el MAb M1825 se vuelven a analizar empleando los cuatro MAB.
- v) *Conjugado:* Se añade a todos los pocillos suero anti-inmunoglobulina G (cadenas pesadas y ligeras) de ratón generado en cabra y conjugado a peroxidasa de rábano, y las placas se incuban 1 hora a TA.
- vi) *Sustrato:* Se añade el sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina-peróxido de hidrógeno a los pocillos y las placas se colocan en un agitador orbital durante 10 minutos a TA. Se miden de inmediato las densidades ópticas (DO) a 620 nm (DO<sub>620</sub>) empleando un lector de ELISA.

Todos los lotes de reactivo, incluidos el antisuero de captura, los antígenos control, los MAB de ratón y el conjugado se analizan de antemano mediante el método de la titulación con doble entrada para determinar qué dilución es la óptima para el análisis de rutina de los líquidos problema. A lo largo de toda la prueba, se emplean volúmenes de 100 µl y las placas se lavan cuatro veces entre una fase y la siguiente empleando PBST.

- vii) *Interpretación de los resultados:* Para que el resultado del ELISA pueda considerarse positivo, el líquido debe dar un resultado positivo no solo frente al MAb central sino también frente al menos uno de los MAB específicos de serotipo. En el cribado inicial con el MAb M1825, la DO<sub>620</sub> media de cada muestra problema se divide por la DO<sub>620</sub> media obtenida con el antígeno control positivo fuerte de *C. fetus* subesp. *fetus* serotipo B y se multiplica por 100% para obtener un porcentaje de positividad (%P). Los líquidos problema con un %P del 14% o superior se considerarán positivos y se volverán a analizar, esta vez con los cuatro MAB. Si también se obtiene un resultado positivo con



M1825 y el valor de DO<sub>620</sub> es de 0,2 o superior con al menos uno de los otros tres MAb específicos de serotipo, se considerará que el ELISA es positivo en cuanto a detección de *C. fetus* ssp. en la muestra de líquido problema original. Todos los viales de MTE correspondientes a muestras de líquido positivas según el ELISA se cultivarán como se describe en el Apartado B.1.4 *Aislamiento de Campylobacter fetus*, con el fin de confirmar el resultado y para determinar la subespecie de la cepa cultivada.

### 1.9. Identificación molecular de subespecies de *Campylobacter fetus*

Se han descrito métodos moleculares para la identificación de subespecies de *C. fetus*, como la secuenciación del gen 16S (Gorkiewicz *et al.*, 2003; On & Harrington, 2001), PFGE (electroforesis en gel de campo pulsado) (On & Harrington, 2001), AFLP (análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados) (Wagenaar *et al.*, 2001) y MLST (tipificación multilocus de secuencias) (van Bergen *et al.*, 2005a). La MLST se ha recomendado para la diferenciación entre cepas de Cff y de Cfv; no obstante, en un estudio reciente se ha descrito una cepa de Cff que se ha aislado con la MLST asociada a Cfv y que presenta el tipo de secuencia (ST) 4 (Iraola *et al.*, 2015), lo cual demuestra que la MLST tampoco es del todo fiable para la diferenciación entre subespecies de *C. fetus*. La secuenciación de todo el genoma permite una caracterización muy fiable de las cepas de *C. fetus* (van der Graaf-van Bloois *et al.*, 2014), pero este método es caro y actualmente no se utiliza demasiado en los laboratorios de diagnóstico.

A los laboratorios en los que se llevan a cabo diagnósticos de forma habitual les resulta más útil una PCR. De varias PCR se ha dicho que son específicas de subespecie, como las desarrolladas por Hum *et al.* (1997), Wang *et al.* (2002), Tu *et al.* (2005), van Bergen *et al.* (2005c) y Abril *et al.* (2007). Sin embargo, no se dispone de ninguna PCR que permita identificar con fiabilidad las cepas de *C. fetus* a nivel de subespecie (van der Graaf-van Bloois *et al.*, 2013) (Tabla 3).

**Tabla 3.** Sensibilidad y especificidad de la identificación de *C. fetus* a nivel de (sub)specie mediante PCR

PCR	Identificación	Diana	Sensibilidad <sup>a</sup>	Especificidad <sup>a</sup>
Abril <i>et al.</i> , 2007	<i>C. fetus</i> Cfv	<i>nahE</i> <i>ISCfe1</i>	100% (143/143) 97% (58/60)	100% (12/12) 100% (95/95)
Van Bergen <i>et al.</i> , 2005c	Cfv	desconocida	45% (27/60)	100% (95/95)
Hum <i>et al.</i> , 1997	<i>C. fetus</i> Cfv	<i>cstA</i> <i>parA</i>	100% (143/143) 58% (46/70)	100% (12/12) 83% (79/95)
McMillen <i>et al.</i> , 2006	Cfv	<i>parA</i>	53% (32/60)	100% (95/95)
Wang <i>et al.</i> , 2002	Cff	<i>sapB2</i>	76% (63/83)	72% (52/72)
Van der Graaf-van Bloois <i>et al.</i> , 2013	<i>C. fetus</i>	<i>nahE</i>	100% (143/143)	100% (12/12)

<sup>a</sup> expresado en forma de porcentaje (número de cepas identificadas de forma correcta/número total de cepas). El estudio incluyó:

143 cepas de *C. fetus*, 60 cepas de Cfv, 83 cepas de Cff, 12 cepas no fetales de *Campylobacter*, 95 cepas no Cfv y 72 cepas no Cff (van der Graaf-van Bloois *et al.*, 2013).

La PCR múltiple descrita por Abril *et al.* (2007) demostró ser fiable para la correcta identificación de *C. fetus*, con un 100% de sensibilidad y un 100% de especificidad, aunque la diana específica de Cfv descrita para esta PCR da lugar a un 97% de sensibilidad y no puede emplearse para diferenciar de forma fiable entre cepas de Cff y de Cfv (van der Graaf-van Bloois *et al.*, 2013). La diana de *C. fetus* en la que se basa esta PCR, el gen *nanE*, puede emplearse para identificar *C. fetus* y también se ha desarrollado como prueba en tiempo real (van der Graaf-van Bloois *et al.*, 2013; McGoldrick *et al.*, 2013).

La PCR descrita por Van Bergen *et al.* (2005c) permite detectar cepas de Cfv del mismo modo que con AFLP, pero la prueba no permite identificar *C. fetus* subesp. *venerealis* biovar *intermedius*. Por lo tanto, esta PCR no es adecuada para fines de diagnóstico (van der Graaf-van Bloois *et al.*, 2013).

La PCR múltiple, descrita por Hum *et al.* (1997) permite amplificar un fragmento de ADN específico de *C. fetus* (aproximadamente 200 pb más pequeño que el de 960 pb descrito en el estudio original), así como un fragmento específico de *C. fetus* subesp. *venerealis*. Mediante la comparación de esta PCR con las pruebas AFLP y MLST (van Bergen *et al.*, 2005a) y con la prueba de la glicina (Willoughby *et al.*, 2005) se confirma que la PCR puede dar tanto falsos positivos como falsos negativos (van der Graaf-van Bloois *et al.*, 2013). En un estudio reciente, esta PCR dio un resultado positivo con una cepa de *C. hyointestinalis* aislada de un toro (Spence *et al.*, 2011). Esta observación hace que el gen diana *parA* específico de *Cfv*, y en consecuencia todas las demás PCR en las que se utilice esta diana, resulten inadecuados para el diagnóstico.

La PCR descrita por Wang *et al.* (2002) solo proporciona un producto específico de *C. fetus* subesp. *fetus*. Estos resultados se obtuvieron tan solo con un número muy pequeño de pruebas. Las evaluaciones de su capacidad para diferenciar subespecies utilizando grupos más amplios de cepas dieron tanto falsos positivos como falsos negativos (van Bergen *et al.*, 2005c; Van der Graaf-van Bloois *et al.*, 2013).

Las PCR para la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), descritas por Tu *et al.* (2005), parece que se han evaluado con un número muy pequeño de cepas de *C. fetus* subesp. *venerealis*. En un estudio reciente, se ha comprobado que la sensibilidad de esta prueba es muy baja (Van der Graaf-van Bloois *et al.*, 2013).

## 2. Pruebas serológicas para la detección de anticuerpos

Existe un ELISA disponible para la detección de anticuerpos IgA específicos de antígeno en el mucus vaginal tras el aborto debido a *C. fetus* subesp. *venerealis*. Estos anticuerpos tienen una larga duración y su concentración permanece constante en el mucus vaginal durante varios meses (Hum *et al.*, 1991). El ELISA no permite diferenciar entre las respuestas de anticuerpos a las distintas subespecies.

El muestreo inicial se puede llevar a cabo tras el periodo inicial de involución (normalmente una semana antes del aborto) cuando el mucus se torna más claro.

Se describe a continuación un ELISA para la detección de la respuesta sérica humoral de IgG después de la vacunación.

### 2.1. Preparación del antígeno y antigenización

Se transfieren colonias a PBS con un 0,5% de formalina durante 1 hora, se centrifugan a 17.000 **g**, se lavan dos veces con PBS, pH 7,5, y se resuspenden a continuación en tampón carbonato 0,05 M, pH 9,6. La absorbancia final se ajusta a  $OD_{610\text{ nm}} = 0,21$ . Placas de poliestireno para microtitulación de fondo plano antigenizadas con 10  $\mu\text{l}$  de antígeno, se dejan toda la noche a 4°C y se conservan luego a -20°C. Antes de su uso, las placas se lavan dos veces con agua destilada y después se elimina su humedad con cuidado.

#### 2.1.1. Procedimiento analítico

- i) Se añade a cada pocillo el mucus vaginal diluido (100  $\mu\text{l}$ ) y la placa se incuba durante 2 horas a 37°C. Se lavan las placas como antes y se añaden 100  $\mu\text{l}$  de anticuerpos anti IgA bovina generados en conejo. Después de una incubación de 2 horas a 37°C, se lavan las placas y se añaden a cada pocillo 100  $\mu\text{l}$  de anticuerpos anti IgG de conejo generados en cabra y conjugados a peroxidasa de rábano. Después de otras 2 horas de incubación a 37°C, se lavan las placas y se añaden 100  $\mu\text{l}$  de sustrato (0,8 mg/ $\mu\text{l}$  de ácido 5 amino-salicílico, pH 6,0), activado inmediatamente por la adición de un 2% de peróxido de hidrógeno 1M. Las placas se dejan a temperatura ambiente durante 30 minutos y se detiene la reacción añadiendo 50  $\mu\text{l}$  de hidróxido sódico 3 M. La absorbancia se mide en un lector de ELISA a 450 nm. Cada muestra se analiza por duplicado, y en cada placa se incluyen controles positivos y negativos. Las mediciones de la absorbancia de las muestras problema se corrigen para las medidas de absorbancia de los controles positivos y negativos según la fórmula siguiente:

$$\text{Resultado} = \frac{\text{Absorbancia}_{\text{muestra}} - \text{Absorbancia}_{\text{control negativo}}}{\text{Absorbancia}_{\text{control positivo}} - \text{Absorbancia}_{\text{control negativo}}} \times 100$$

- ii) La prueba se considera positiva si el resultado es superior a 40. Los animales vacunados no reaccionan al ELISA con IgA ya que su mucus vaginal solo contiene anticuerpos de isotipo IgG.

## C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS Y EL MATERIAL DE DIAGNÓSTICO

### ESTE APARTADO SE ADOPTÓ EN 2008 Y ACTUALMENTE SE ESTÁ PLANTEANDO SU REVISIÓN

En algunos países, se dispone de vacunas a la venta para ovejas y/o ganado bovino. Se reconocen dos grupos de antígenos de *C. fetus*: los antígenos flagelares “H”, que son termolábiles y los antígenos somáticos “O”, que son termoestables. Además, debe estar presente un antígeno capsular “K”. El antígeno K se destruye fácilmente en condiciones de *in vitro*. La vacuna debe incorporar estos antígenos diferentes. También se han descrito otras preparaciones de vacunas (Clarke *et al.*, 1972). La vacuna contra *C. fetus* subesp. *fetus* confiere inmunidad contra *C. fetus* subesp. *venerealis* porque las dos cepas tienen los mismos antígenos (Bouters *et al.*, 1973). Sin embargo, la adición al producto biológico de una segunda cepa de *C. fetus* subesp. *venerealis* es una práctica común que se sugiere encarecidamente. Es importante la presencia de cuatro o cinco inmunógenos proteicos sensibles al calor que son compartidos por muchas cepas de *C. fetus* subesp. *venerealis* y *C. fetus* subesp. *fetus*. Debe confirmarse la presencia de tales inmunógenos. La concentración de la vacuna (peso en seco) debe estar en torno a los 40 mg de proteína por dosis a fin de conseguir un buen nivel de protección

En poblaciones infectadas, todos los animales para reproducción, incluyendo los toros, las vacas y las terneras, se vacunarán dos veces antes del periodo de cría. En la mayoría de los casos, la vacuna reduce la duración de la infección y las vacas portadoras pueden conservar la infección de un periodo al siguiente. Los toros necesitan dos dosis vacunales al año, ya que la vacuna no siempre es eficaz para acabar con las infecciones establecidas.

Los toros y novillas del año siguiente se vacunan, y los toros del tercer año en adelante se vacunan anualmente.

En poblaciones no infectadas solo se vacunan los toros una vez al año, pero debe hacerse dos veces al año (dos dosis con un intervalo de 21 días, 2 semanas antes del comienzo de la estación de cría).

### 1. Control de inóculos

#### 1.1. Características del inóculo

El inóculo consiste en un lote grande y homogéneo de un cultivo de *C. fetus* subesp. *fetus* o de *C. fetus* subesp. *venerealis* que se ha caracterizado cuidadosamente e identificado en cuanto a pureza, conservado en pequeñas alícuotas.

#### 1.2. Método de cultivo

El crecimiento inicial del inóculo tiene lugar en un medio sólido. Este consiste en un medio base al que se añade 0,16% de agar. El medio base se compone de 2,8% de caldo de *Brucella*, 0,5% de extracto de levadura, 1,2% de succinato sódico, y 0,001% de cloruro cálcico. El cultivo inicial se mantiene 3 días a 37°C en las condiciones especificadas (véase el Apartado B.1.4.2). El cultivo se pasa a tubos adicionales con medio semisólido y se incuba durante 48 horas. El material resultante se utiliza para la producción de vacunas.

Este cultivo debe conservarse a 4°C.

#### 1.3. Validación como vacuna

El inóculo debe estar libre de organismos contaminantes. La pureza del inóculo debe comprobarse por un método de cultivo apropiado.

No resulta práctico probar la eficacia en condiciones de laboratorio. Se determina en el campo por observaciones epidemiológicas.

### 2. Método de producción

El material de siembra se cultiva en un medio líquido formado por un medio base al que se añade 0,025% de tioglicolato sódico. Estos cultivos se incuban durante 24 horas a 37°C con agitación a 80 rpm. Se recogen los líquidos y se añade formaldehído a una concentración final de 0,2% (0,74 g/litro)

La vacuna se mezcla con un adyuvante de emulsión oleosa.

### 3. Control del proceso

Se debe comprobar la identidad del microorganismo mediante cultivo e identificación, así como la ausencia de microorganismos contaminantes.

### 4. Control de lotes

#### 4.1. Esterilidad

Las pruebas para esterilidad y ausencia de contaminación del material biológico de uso veterinario se pueden encontrar en el capítulo 1.1.9.

#### 4.2. Inocuidad

El proceso de inactivación debe ser completo y debe validarse el método para asegurar la inactivación antes de que pueda usarse de forma segura. La inactivación se comprueba inoculando el equivalente de una dosis en el mismo medio y bajo las mismas condiciones que las utilizadas en el proceso de producción. Este cultivo se incuba 72 horas en las mismas condiciones, después de las cuales no debe haber evidencia de crecimiento bacteriano. El producto final también debe estar libre de contaminantes bacterianos y fúngicos viables, utilizando métodos adecuados de cultivo.

Se inoculan dos cobayas con 2 ml del producto por vía intramuscular o subcutánea. No debe haber una reacción adversa atribuible a la vacuna durante un período de observación de 7 días después de la inoculación.

#### 4.3. Potencia

La potencia de la vacuna puede medirse por seroconversión en conejos. Se miden sus títulos séricos mediante inmunofluorescencia o por la prueba de aglutinación en tubo. Se vacunan subcutáneamente dos veces, con la mitad de la dosis utilizada en el ganado bovino, cinco conejos que sean serológicamente negativos a una dilución 1/100 del suero, con un intervalo de 14 días. Como mínimo, el suero de cuatro de los cinco ratones, recogido 14 días después de la segunda vacunación, debe mostrar un incremento en el título de al menos cuatro veces.

### 5. Pruebas sobre el producto final

#### 5.1. Inocuidad

Véase el Apartado C.4.2.

#### 5.2. Potencia

Véase el Apartado C.4.3.

## BIBLIOGRAFÍA

ABRIL C., VILEI E.M., BRODARD I., BURNENS A., FREY J. & MISEREZ R. (2007). Discovery of Insertion Element ISCfe1: A new tool for *Campylobacter fetus* subspecies differentiation. *Clin. Microbiol. Infect.*, **13**, 993–1000.

BESSEDE E., SOLECKI O., SIFRE E., LABADI L. & MEGRAUD F. (2011). Identification of *Campylobacter* species and related organisms by matrix assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *Clin. Microbiol. Infect.*, **17**, 1735–1739.

BOUTERS R., DE KEYSER J., VANDEPLASSCHE M., VAN AERT A., BRONE E. & BONTE P. (1973). *Vibrio fetus* infections in bulls: curative and preventive vaccination. *Br. Vet. J.*, **129**, 52–57.

BROOKS B.W., DEVENISH J., LUTZE-WALLACE C.L., MILNES D., ROBERTSON R.H. & BERLIE-SURUJBALLI G. (2004). Evaluation of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Campylobacter fetus* in bovine preputial washing and vaginal mucus samples. *Vet. Microbiol.*, **103** (1–2), 77–84.

- BROOKS B.W., ROBERTSON R.H., LUTZE-WALLACE C.L. & PFAHLER W. (2002). Monoclonal antibodies specific for *Campylobacter fetus* lipopolysaccharides. *Vet. Microbiol.*, **87**, 37–49.
- CAMPERO C.M., MOORE D.P., ODEON A.C., CIPOLLA A.L. & ODRIOZOLA E. (2003). Aetiology of bovine abortion in Argentina. *Vet. Res. Commun.*, **27**, 359–369.
- CHANG W. & OGG J.E. (1971). Transduction and mutation to glycine tolerance in *Vibrio fetus*. *Am. J. Vet. Res.*, **32**, 649–653.
- CLARKE B.L. & DUFTY J.H. (1978). Isolation of *Campylobacter fetus* from bulls. *Aust. Vet. J.*, **54**, 262–263.
- CLARKE B.L., DUFTY J.H. & MONSBOURGH M.J. (1972). Immunisation against bovine vibriosis. 1. Comparison of the protective properties of bacterins prepared by two methods. *Aust. Vet. J.*, **48**, 376–381 and 382–384.
- DEVENISH J., BROOKS B., PERRY K., MILNES D., BURKE T., MCCABE D., DUFF S. & LUTZE-WALLACE C.L. (2005). Validation of a monoclonal antibody-based capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Campylobacter fetus*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **12** (11), 1261–1268.
- FITZGERALD C., TU Z.C., PATRICK M., STILES T., LAWSON A.J., SANTOVENIA M., GILBERT M.J., VAN BERGEN M., JOYCE K., PRUCKLER J., STROIKA S., DUIM B., MILLER W.G., LOPAREV V., SINNIGE J.C., FIELDS P.I., TAUXE R.V., BLASER M.J. & WAGENAAR J.A. (2014). *Campylobacter fetus* subsp. *testudinum* subsp. nov., isolated from humans and reptiles. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **64** (Pt 9), 2944–2948. doi: 10.1099/ijs.0.057778-0. Epub 2014 Jun 4.
- FLORENT A. (1959). Les deux vibrioses génitales de la bête bovine : La vibriose vénérienne, due à *Vibrio foetus venereal*, et la vibriose d'origine intestinale due à *V. foetus intestinalis*. *Proceedings 10th International Veterinary Congress Madrid*, **2**, 953–957.
- GARCIA M.M., EAGLESOME M.D. & RIGBY C. (1983). *Campylobacter* important to veterinary medicine. *Vet. Bull.*, **53**, 793–818.
- GARCIA M.M., STEWART R.B. & RUCKERBAUER G.M. (1984). Quantitative evaluation of a transport-enrichment medium for *Campylobacter fetus*. *Vet. Rec.*, **115**, 434–436.
- GORKIEWICZ G., FEIERL G., SCHÖBER C., DIEBER F., KÖFER J., ZECHNER R. & ZECHNER E.L. (2003). Species-specific identification of *Campylobacter* by partial 16S rRNA gene sequencing. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 2537–2546.
- HARLOW E. & LANE D. (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York, USA.
- HARVEY S.M. & GREENWOOD J.R. (1983). Relationship among catalase-positive *Campylobacter* determined by deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridisation. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **33**, 275–284.
- 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. *venereal* from cattle. *Aust. Vet. J.*, **71**, 184–186.
- HUM S., QUINN K., BRUNNER J. & ON S.L.W. (1997). Evaluation of a PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. *Aust. Vet. J.*, **75**, 827–831.
- HUM S., STEPHENS L.R. & QUINN C. (1991). Diagnosis by ELISA of bovine abortion due to *Campylobacter fetus*. *Aust. Vet. J.*, **68**, 272–275.
- IRAOLA G., BETANCOR L., CALLEROS L., GADEA P., ALGORTA G., GALEANO S., MUXI P., GREIF G. & PEREZ R. (2015). A rural worker infected with a bovine-prevalent genotype of *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* supports zoonotic transmission and inconsistency of MLST and whole-genome typing. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **34**, 1593–1596.
- MCGOLDRICK A., CHANTER J., GALE S., PARR J., TOSZEGHY M. & LINE K. (2013). Real Time PCR to detect and differentiate *Campylobacter fetus* subspecies *fetus* and *Campylobacter fetus* subspecies *venereal*. *J. Microbiol. Methods*, **94**, 199–204.
- MCMILLEN L., FORDYCE G., DOOGAN V.J. & LEW A.E. (2006). Comparison of culture and a novel 5' Taq nuclease assay for direct detection of *Campylobacter fetus* subsp. *venereal* in clinical specimens from cattle. *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 938–945.

- MELICK P. W., WINTER A.J. & McENTEE K. (1965). Diagnosis of vibriosis in the bull by use of the fluorescent antibody technic. *Cornell Vet.*, **55**, 280–294.
- MONKE H.J., LOVE B.C., WITTUM T.E., MONKE D.R. & BYRUM B.A. (2002). Effect of transport enrichment medium, transport time, and growth medium on the detection of *Campylobacter fetus* subesp. *venerealis*. *J. Vet. Invest.*, **14**, 35–39
- ON S.L.W. (1996). Identification methods for Campylobacters, Helicobacters and related organisms. *Clin. Microb. Rev.*, **9**, 405–422.
- ON S.L.W. & HARRINGTON C.S. (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.
- SALAMA S.M., GARCIA M.M. & TAYLOR D.E. (1992). Differentiation of the subspecies of *Campylobacter fetus* by genomic sizing. *Int. J. Syst. Bact.*, **42**, 446–450.
- SPENCE R.P., BRUCE I.R., MCFADDEN A.M., HILL F.I., TISDALL D., HUMPHREY S., VAN DER GRAAF L., VAN BERGEN M.A. & WAGENAAR J.A. (2011). Cross-reaction of a *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* real-time PCR. *Vet. Rec.*, **168**, 131.
- Steele T.W. & McDermott S.N. (1984). The use of membrane filters applied directly to the surface of agar plates for the isolation of *Campylobacter jejuni* from feces. *Pathology*, **16**, 263–265.
- TEDESCO L.F., ERRICO F. & DEL BAGLIVI P.L. (1977). Comparison of three sampling methods for the diagnosis of genital vibriosis in the bull. *Aust. Vet. J.*, **53**, 470–472.
- TU Z.C., EISNER W., KREISWIRTH B.N. & BLASER M.J. (2005). Genetic divergence of *Campylobacter fetus* strains of mammal and reptile origins. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 3334–3340.
- VAN BERGEN M.A.P., DINGLE K.E., MAIDEN M.C., NEWELL D.G., VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS L., VAN PUTTEN J.P. & WAGENAAR J.A. (2005a). Clonal nature of *Campylobacter fetus* as defined by multilocus sequence typing. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 5888–5898.
- VAN BERGEN, M.A.P., LINNANE S., VAN PUTTEN J.P. & WAGENAAR J.A. (2005b). Global detection and identification of *Campylobacter fetus* subesp. *venerealis*. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **24**, 1017–1026.
- VAN BERGEN M. A. P., SIMONS G., VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS L., VAN PUTTEN J.P., ROMBOUT J., WESLEY I. & J. WAGENAAR J.A. (2005c). Amplified fragment length polymorphism based identification of genetic markers and novel PCR assay for differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. *J. Med. Microbiol.*, **54**, 1217–1224.
- VANDAMME P. (2000). Taxonomy of the family Campylobacteraceae. In: *Campylobacter*, Second Edition Nachamkin I. & Blaser M.J., eds. ASM Press, Washington DC, USA, 3–26.
- VANDAMME P., POT B., FALSEN E., KERSTERS K. & DE LEY J. (1990). Intra- and interspecific relationships of veterinary *Campylobacters* revealed by numerical analysis of electrophoretic protein profiles and DNA:DNA hybridizations. *System. Appl. Microbiol.*, **13**, 295–303.
- VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS L., VAN BERGEN M.A.P., VAN DER WAL F.J., DE BOER A.G., DUIM B., SCHMIDT T & WAGENAAR J.A. (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.
- VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS L., MILLER W.G., YEE E., RIJNSBURGER M., WAGENAAR J.A. & DUIM B. (2014). Inconsistency of phenotypic and genomic characteristics of *Campylobacter fetus* subspecies requires re-evaluation of current diagnostics. *J. Clin. Microbiol.*, **52**, 4183–4188.
- VÉRON M. & CHATELAIN R. (1973). Taxonomic study of the genus *Campylobacter* Sebald and Véron and designation of the neotype strain for the type species *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Véron. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **23**, 122–134.
- WAGENAAR J.A., VAN BERGEN M.A.P., BLASER M.J., TAUXE R.V., NEWELL D.G. & VAN PUTTEN J.P.M. (2014). *Campylobacter fetus* infections in humans: exposure and disease. *Clin. Infect. Dis.*, **58** (11), 1579–1586.

WAGENAAR J.A., VAN BERGEN M.A.P., NEWELL D.G., GROGONO-THOMAS R. & DUIM B. (2001). Comparative study using amplified fragment length polymorphism fingerprinting and phenotyping to differentiate *Campylobacter fetus* strains isolated from animals. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 2283–2286.

WANG G., CLARK C.G., TAYLOR T.M., PUCKNELL C., BARTON C., PRICE L., WOODWARD D.L. & RODGERS F.G. (2002). Colony multiplex PCR assay for the identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subesp. *fetus*. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 4744–4747.

WILLOUGHBY K., NETTLETON P.F., QUIRIE M., MALEY M.A., FOSTER G., TOSZEGHY M. & NEWELL D.G. (2005). A multiplex polymerase chain reaction to detect and differentiate *Campylobacter fetus* subspecies *fetus* and *Campylobacter fetus* -species *venerealis*: use on UK isolates of *C. fetus* and other *Campylobacter* spp. *J. Appl. Microbiol.*, **99**, 758–766.

\*  
\* \*

**NB:** Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la campilobacteriosis genital bovina (puede consultarse en la Tabla de la Parte 4 de este *Manual Terrestre* o en la página web de la OIE:

<http://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica/laboratorios-de-referencia/lista-des-laboratorios/>).

Por favor, contacte con el Laboratorio de Referencia de la OIE para cualquier otro dato sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la campilobacteriosis genital bovina.

**NB:** ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1990: ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2017.