



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**  
**Facultad de Ciencias Veterinarias**

# **Caracterización diagnóstica de las causas infecciosas del aborto bovino**

**Presentado por la Médica Veterinaria Eleonora Morrell**

**Director: Dr. Carlos M. Campero**  
**CoDirector: Dr. Eduardo Gimeno**

Trabajo de tesis realizado como requisito para optar al título de  
Doctor en Ciencias Veterinarias

Realizado en el Laboratorio de Patología Veterinaria, Grupo de Sanidad  
Animal, Area de Producción Animal, INTA Estación Experimental Agropecuaria  
de Balcarce

Miembros del Jurado: Dr. Julio Carfagnini  
Dr. Anselmo Odeón  
Dr. Alfredo Martínez

2010

## DEDICATORIA

A mis padres Lidia y Horacio  
por su incondicional apoyo durante todos estos años.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi Director Dr. Carlos Campero por haberme dado la oportunidad para realizar la tesis doctoral y por aprender a su lado la patología fetal, siendo mi maestro y principal referente para este trabajo. Quiero agradecerle además por su actitud y condición humana cuando se presentaron problemas de índole personal.

A mi codirector Dr. Eduardo Gimeno y al Dres. Anselmo Odeón y Claudio Barbeito por su ayuda y aportes en el desarrollo de esta tesis.

A todos los auxiliares de laboratorio del Grupo de Sanidad Animal del INTA Balcarce, especialmente a Kikí y a Tania, por su buen carácter y predisposición.

A los exresidentes por su compañerismo y por trabajar a mi lado durante las necropsias de los fetos y recolección de las muestras.

A Alejandra Velilla por brindarme sus conocimientos sobre la técnica de PCR en el comienzo de la parte experimental y a Adriana Cano por su ayuda con el análisis estadístico de los datos.

A Vero, Bernardino, Yanina, Maia, Quique y Lorena.

# TABLA DE CONTENIDOS

## TRABAJOS PUBLICADOS CONTENIENDO ASPECTOS PARCIALES DEL TRABAJO DE TESIS

TRABAJOS PUBLICADOS EN REVISTAS CIENTÍFICAS.....7

ABREVIATURAS .....8

A. RESUMEN .....10

B. PALABRAS CLAVE .....11

C. SUMMARY .....12

D. KEY WORDS .....13

1. INTRODUCCIÓN .....14

1.1. DEFINICIÓN DE ABORTO BOVINO .....14

1.2. GENERALIDADES .....14

1.3. PLACENTA .....16

1.4. PATOGENIA DEL ABORTO BOVINO.....17

1.5. INMUNIDAD FETAL Y MATERNA DURANTE LA GESTACIÓN .....19

1.6. CARACTERIZACIÓN DIAGNÓSTICA DEL ABORTO BOVINO.....21

1.7. CAUSAS INFECCIOSAS DE ABORTO BOVINO.....24

1.7.1. BACTERIAS .....24

1.7.1.1. *Brucella abortus* .....24

1.7.1.2. *Campylobacter fetus* .....26

1.7.1.3. *Leptospira spp.* .....28

1.7.1.4. Bacterias oportunistas .....29

1.7.2. VIRUS .....32

1.7.2.1. *Diarrea Viral Bovina* .....32

1.7.2.2. *Herpes virus Bovino-1* .....33

1.7.3. PROTOZOOS.....35

1.7.3.1. *Neospora caninum* .....35

1.7.3.2. *Tritrichomonas foetus* .....36

1.7.3.3. *Toxoplasma gondii* .....38

1.7.3.4. *Sarcocystis spp.* .....38

1.7.4. HONGOS .....39

1.7.5. CAUSAS INFECCIOSAS POCO FRECUENTES DE ABORTO BOVINO .....40

1.7.5.1. *Mycoplasmas* y *Ureaplasma* .....40

1.7.5.2. *Chlamydias* .....40

1.7.5.3. *Aborto Bovino Epizootico* .....41

1.8. CAUSAS NO INFECCIOSAS DE ABORTO BOVINO .....42

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....44

2.1. HIPÓTESIS .....44

2.2. OBJETIVOS GENERALES.....44

2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....44

3. MATERIALES Y MÉTODOS.....45

3.1. EXÁMENES DE FETOS Y PLACENTAS .....45

3.1.1. Antecedentes, necropsia, estudio macroscópico y obtención de muestras .....45

3.2. CULTIVOS MICROBIOLÓGICOS .....46

3.2.1. Frotis de contenido abomasal .....47

3.3. CULTIVOS VIRALES .....47

3.4. HISTOPATOLOGÍA .....48

3.5. TÉCNICAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA.....	48
3.5.1. <i>Neospora caninum</i> .....	49
3.5.2. <i>Leptospira spp.</i> .....	49
3.5.3. IHQ de otros agentes infecciosos.....	50
3.6. LECTINHISTOQUÍMICA.....	51
3.7. TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA (IF).....	52
3.7.1. IF indirecta para <i>Neospora caninum</i> .....	52
3.7.2. IF directa para <i>Leptospira spp.</i> .....	53
3.7.3. IF directa para <i>Campylobacter fetus</i> .....	53
3.8. PRUEBA DE SERONEUTRALIZACIÓN VIRAL.....	54
3.9. TÉCNICA DE PCR.....	54
3.10. CAUSAS DETERMINADAS INFECCIOSAS.....	55
3.10.1. BACTERIAS.....	55
3.10.1.1. <i>Brucella abortus</i> .....	55
3.10.1.2. <i>Campylobacter fetus</i> .....	56
3.10.1.3. <i>Leptospira spp.</i> .....	57
<i>PCR multiplex para B. abortus y Leptospira spp</i> .....	58
3.10.1.4. Bacterias oportunistas.....	59
3.10.2. VIRUS.....	59
3.10.2.1. <i>Diarrea Viral Bovina</i> .....	59
3.10.2.2. <i>Herpes virus Bovino- I</i> .....	60
3.10.3. PROTOZOOS.....	61
3.10.3.1. <i>Neospora caninum</i> .....	61
3.10.3.2. <i>Tritrichomonas foetus</i> .....	62
3.11. CAUSAS DETERMINADAS NO INFECCIOSAS.....	63
3.12. CAUSAS INDETERMINADAS.....	63
3.13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	63
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>64</b>
4.1. CAUSAS DETERMINADAS INFECCIOSAS.....	65
4.1.1. Cultivos microbiológicos y frotis de contenido abomasal.....	67
4.1.2. BACTERIAS.....	68
4.1.2.1. <i>Brucella abortus</i> .....	68
4.1.2.2. <i>Campylobacter fetus</i> .....	72
4.1.2.3. <i>Leptospira spp.</i> .....	76
4.1.2.4. Bacterias oportunistas.....	81
4.1.3. VIRUS.....	82
4.1.3.1. Cultivos virológicos.....	82
4.1.3.2. Prueba de seroneutralización viral.....	83
4.1.3.3. <i>Diarrea Viral Bovina</i> .....	83
4.1.3.4. <i>Herpes virus Bovino-I</i> .....	85
4.1.4. PROTOZOOS.....	85
4.1.4.1. <i>Neospora caninum</i> .....	85
4.1.4.2. <i>Tritrichomonas foetus</i> .....	89
4.2. CAUSAS DETERMINADAS NO INFECCIOSAS.....	91
4.3. CAUSAS INDETERMINADAS.....	92
<b>5. DISCUSION GENERAL.....</b>	<b>94</b>
5.1. BACTERIAS.....	95
5.1.1. <i>Brucella abortus</i> .....	95
5.1.2. <i>Campylobacter fetus</i> .....	97
5.1.3. <i>Leptospira spp.</i> .....	99
5.1.4. Bacterias oportunistas.....	101
5.2. VIRUS.....	102
5.2.1. <i>Diarrea Viral Bovina</i> .....	102
5.2.2. <i>Herpes virus Bovino-I</i> .....	103
5.3. PROTOZOOS.....	104
5.3.1. <i>Neospora caninum</i> .....	104
5.3.2. <i>Tritrichomonas foetus</i> .....	106

5.4. MALFORMACIONES CONGÉNITAS .....	107
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>109</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>110</b>
APENDICE 1 .....	149
APENDICE 2 .....	150
APENDICE 3 .....	151
APENDICE 4 .....	153
APENDICE 5 .....	154
APENDICE 6 .....	155
APENDICE 7 .....	156
APENDICE 8 .....	157
APENDICE 9 .....	158
APENDICE 10 .....	159
APENDICE 11 .....	160

## TRABAJOS PUBLICADOS EN REVISTAS CIENTÍFICAS CONTENIENDO ASPECTOS PARCIALES DEL TRABAJO DE TESIS

1. MORRELL, EL, BOHN, KA, POSO, MA, CAMPERO, CM. Utilización de técnicas diagnósticas para la identificación de *Leptospira spp.* en tejidos fetales bovinos. Vet. Arg. 23: 333-342. 2006.

2. FERNÁNDEZ, ME; CAMPERO, CM; MORRELL, E; CANTÓN, GJ; MOORE, DP; CANO, A; MALENA, R; ODEÓN, AC; PAOLICCHI, F; ODRIOZOLA, E. Pérdidas reproductivas en bovinos causadas por abortos, muertes prematuras, natimortos y neonatos: casuística del período 2006-2007. Rev. Med. Vet. 88 (6): 246-254. 2007.

3. MORRELL, EL, MOORE, DP, ODEÓN, AC, POSO, MA, ODRIOZOLA, E, CANTÓN, G, PAOLICCHI, F, MALENA, R, LEUNDA, MR, MORSELLA, C, CAMPERO, CM. Retrospective study of bovine neonatal mortality: cases reported from Inta Balcarce, Argentina. Rev. Arg. Microbiol. 40: 151-157. 2008.

4. MOORE, DP, REGIDOR-CERRILLO, J, MORRELL, EL, POSO, MA, CANO, DB, LEUNDA, MR, LINSCHINKY, L, ODEÓN, AC, ODRIOZOLA, E, ORTEGA-MORA, LM, CAMPERO, CM. The role of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in spontaneous bovine abortion in Argentina. Vet. Parasitol. 156: 163-167. 2008.

5. MORRELL, EL, BARBEITO, CG, ODEON, CA, GIMENO, EJ, CAMPERO, CM. Histopathological, Immunohistochemical, Lectin histochemical and Molecular Findings in Spontaneous Bovine Abortions by *Campylobacter fetus*. Reprod. Dom. Anim 2010. (on line).

## ABREVIATURAS

ACTH: hormona adrenocorticotrófica hipofisaria

ASB: albúmina sérica bovina

BPA: buffered plate antigen

CIH: ácido clorhídrico

CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono

CP: citopático

DICC<sub>50</sub>/ml: dosis infecciosa media en cultivo de células por mililitro

ELISA: enzyme linked immunosorbent assay

EMJH: Ellinghausen McCullough Johnson Harris

FLP:

°C: grados centígrados

HVB: herpesvirus bovino

H: hidrógeno

Igs: inmunoglobulinas

IL: interleuquinas

IFN- $\gamma$ : interferón gam

IFD: inmunofluorescencia directa

IFI: inmunofluorescencia indirecta

IHQ: inmunohistoquímica

MAT: test de microaglutinación

MDBK: madin-darby bovine kidney

$\mu$ g/ ml: microgramos por mililitro

$\mu$ m: micrómetros

MEM: minimum essential medium

MCV: mucus cérvicovaginal

M: molar

NK: natural killer

NCP: no citopático

N: normal

O<sub>2</sub>: oxígeno

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PI: persistentemente infectado  
PBS: solución fisiológica bufferada  
rt-PCR: PCR de transcripción reversa  
SFB: suero fetal bovino  
SNC: sistema nervioso central  
SSTE: solución salina tampón estéril  
rpm: revoluciones por minuto  
TA: temperatura ambiente  
Th: linfocitos helper  
vDVB: virus de la Diarrea Viral Bovina

## A. RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue el desarrollo y la aplicación de técnicas diagnósticas mejoradas para aumentar la eficiencia del diagnóstico del aborto bovino. Para ello, se realizó la necropsia de 150 fetos bovinos, provenientes de casos espontáneos de abortos de rodeos para producción de carne y leche. Los fetos fueron remitidos para diagnóstico por veterinarios rurales y de laboratorios de diagnóstico veterinario privados durante los años 2004, 2005 y parte de 2006, y se procesaron en los laboratorios del Grupo de Sanidad Animal del INTA Balcarce. En la necropsia de los fetos se identificaron las lesiones macroscópicas; se estimó la edad fetal, el sexo y el grado de autólisis en una escala subjetiva y se recolectaron diversas muestras para análisis histopatológicos e inmunohistoquímicos, cultivo bacteriológico y aislamiento viral. Además se aplicaron técnicas serológicas para identificar anticuerpos de *Neospora caninum*, vDVB, HVB-1 y finalmente se aplicó la técnica de PCR para diferentes agentes infecciosos. Del total de especímenes, 104 (69,2%) provenían de rodeos para carne y 35 (23,4%) de rodeos lecheros, en 11 fetos (7,4%) no se registró el origen. Setenta y seis (50,6%) fetos fueron machos y 58 (38,6%) hembras mientras que en 16 (10,6%) oportunidades no se consignaron los datos. El 61,0% de los fetos presentó autólisis moderada (grado 2) o severa (grado 3), mientras que en el 22,0% de los casos la autólisis fetal fue leve (grado 1) y en el 24,0% restante no se registraron estos datos. Las edades de gestación de la mayoría de los fetos analizados correspondió al tercer trimestre de la gestación. El diagnóstico etiológico se determinó en 75/150 (50,0%) especímenes siendo las causas más frecuentes las de origen infeccioso (69/150, 46,0%). Las 69 causas infecciosas se diagnosticaron por cultivos microbiológicos (27 causas bacterianas: *Campylobacter fetus* (14 casos), *Brucella abortus* (6 casos), *Arcanobacterium pyogenes* (2 casos), *Aeromonas hydrophila* (1 caso), *Listeria monocytogenes* (1 caso), *Streptococcus* alfa hemolítico (3 casos) y *Tritrichomonas foetus* (2 casos), cultivos virológicos (2 casos vDVB), IFD (11 casos *Leptospira spp.*), histopatología e IHQ (11 casos de *N. caninum*) y con el auxilio de la técnica de PCR en 15 fetos (*B. abortus*: 4 casos, *N. caninum*: 11 casos) con diagnóstico indeterminado. Por último, un caso de aborto micótico (*Aspergillus fumigatus*) fue diagnosticado

por la presencia de lesiones macroscópicas, histopatológicas y por la observación de las hifas del hongo con la tinción de Grocott. Se analizaron 110 fluidos de cavidades fetales y se obtuvieron títulos al vDVB en 15/110 (13,6%) y al HVB 14/110 (12,7%), respectivamente. La detección de anticuerpos para *N. caninum* por IFI se logró en 11/94 (11,7%) fluidos fetales. En 6 oportunidades (4,0%) se establecieron causas no infecciosas : malformaciones congénitas (4 casos) y de origen iatrogénico (2 casos). Los casos indeterminados fueron 75/150 (50,0%), de los cuales 39/150 (26,0%) presentaron lesiones histológicas sugestivas de origen infeccioso, mientras que en 34/150 (22,6%) no se observaron lesiones histopatológicas. Se concluye que si bien las causas infecciosas siguen siendo las principales responsables en la etiología del aborto bovino (46,0%), *N. caninum* fue el agente infeccioso identificado con mayor frecuencia (22/150, 14,6%). La autólisis fetal actuó en detrimento de la eficiencia y sensibilidad de la mayoría de las técnicas diagnósticas utilizadas. Con el auxilio de la técnica de PCR se pudieron identificar 15 casos que presentaban previamente diagnóstico indeterminado por los métodos convencionales, permitiendo mejorar la eficiencia diagnóstica del aborto bovino en un 10,0%.

## **B. PALABRAS CLAVE**

Aborto, bovino, técnicas de diagnóstico, PCR

## C. SUMMARY

The main objective of this study was to develop and implement improved diagnostic techniques to increase the efficiency of the diagnosis of bovine abortion. Necropsies were performed on 150 bovine fetuses, from spontaneous cases of abortions belonging to beef and dairy herds. The fetuses were referred for diagnostic from rural veterinarians and private veterinary diagnostic laboratories in the years 2004, 2005 and part of 2006, and processed in the laboratories of the Animal Health Group of INTA Balcarce. In the necropsy of the fetuses the lesions were identified, foetal age, sex and degree of autolysis were estimated on a subjective scale and several samples were collected for histopathology, immunohistochemistry, bacteria culture, viral isolation, identification of antibodies against *Neospora caninum*, BVDV, BHV-1 through serological techniques and finally the PCR technique for different infectious agents. Foetuses belonged to beef (104, 69.2%) and dairy (35, 23.4%) herds, in 11 fetuses (7.4%) the type of herd was unknown. Seventy-six (50.6%) fetuses were male and 58 (38.6%) female while in 16 (10.6%) opportunities were not determined. 61.0% of the fetuses showed moderate (grade 2) or severe (grade 3) autolysis, while 22.0% of cases foetal autolysis was mild (grade 1) and in the remaining 24.0% these data were not recorded. The gestational ages of the most fetuses analyzed corresponded to the third trimester of the pregnancy. The etiologic cause of abortion was determined on 75/150 (50.0%) specimens and the most common causes were infectious (69/150, 46.0%). These 69 infectious cases were diagnosed by microbiological cultures (27 bacterial causes: *Campylobacter fetus* (14 cases) *Brucella abortus* (6 cases), *Arcanobacterium pyogenes* (2 cases), *Aeromonas hydrophila* (1 case), *Listeria monocytogenes* (1 case), *Streptococcus alpha hemolytic* (3 cases) and *Tritrichomonas fetus* (2 cases), virological cultures (2 cases BVDV), IFD (11 cases *Leptospira spp.*), histopathology and IHC (11 cases of *N. caninum*) and PCR in 15 fetuses (*B. abortus*: 4 cases, *N. caninum*: 11 cases) with undetermined diagnosis. Finally a mycotic abortion (*Aspergillus fumigatus*) was diagnosed by the presence of gross lesions, histopathology and presence of hyphae stained with Grocott. Antibodies to BVDV and HVB were found in foetal fluids in 15/110 (13.6%) and 14/110 (12.7%) specimens respectively.

Antibodies against *N. caninum* by IFA were identified in 11/94 (11.7%) foetal fluids. In 6 (4.0%) opportunities non-infectious causes were established: 4 cases of congenital malformations and 2 cases of iatrogenic origin. When a histopathological examination was performed on 75/150 (50.0%) indeterminate cases, 39 (26.0%) had histologic lesions compatible with infectious agents, while in 34 (22.6%) cases lesions were not observed. Infectious agents were the main causes in the aetiology of bovine abortion (46.0%). However, *N. caninum* was the most frequently agent identified (22/150, 14.6%). Foetal autolysis reduced the efficiency and sensitivity of most diagnostic techniques used. The PCR technique identified further 15 cases with indeterminate diagnosis by conventional methods, improving the diagnostic efficiency of bovine abortion by 10.0%.

#### **D. KEY WORDS**

Bovine, abortion, diagnostic techniques, PCR

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. DEFINICIÓN DE ABORTO BOVINO

El aborto es la expulsión de un feto no viable eliminado antes de su período normal de gestación siendo incapaz de llevar una vida independiente (Hubbert et al., 1973, Miller et al., 1977). Se considera aborto en el bovino cuando la expulsión del feto ocurre entre los 42 y 260 días de gestación (Committee on Bovine Reproductive Nomenclature, 1972, Miller et al 1986).

## 1.2. GENERALIDADES

El aborto bovino es uno de los factores más críticos para la producción bovina a nivel mundial dado que la interrupción de la gestación es altamente costosa y produce cuantiosas pérdidas económicas. Las causas del aborto bovino han sido estudiadas en diversos países (Hubbert et al., 1973, Loeffler et al., 1984, Anderson et al., 1990, Kirkbride et al., 1992, Alves et al., 1996, Jamaluddin et al., 1996, Agerholm et al., 1997, VIDA 2000, 2001; Kim et al., 2002, Campero et al., 2003, Easton et al., 2003, Khodakaram et al., 2005, Carpenter et al., 2006, Corbellini et al., 2006, Reitt et al., 2007, Konnai et al., 2008) existiendo diferencias entre las distintas regiones ganaderas.

Argentina es un país reconocido a nivel mundial por la calidad y exportación de sus carnes. El *stock* bovino en el país tuvo su pico máximo en el año 2007 con 58,4 millones de cabezas para descender, desde dicha fecha y llegar a enero del 2010 con 51,5 millones (Rearte, 2010), concentrándose principalmente en la región de la Pampa Húmeda (38 millones) y en menor proporción en las regiones del Nordeste argentino (7,7 millones), Noroeste argentino (1,7 millones), Cuyo (1,4 millones) y Patagonia (0,8 millones) (Rearte, 2010). La importante disminución de vientres a nivel nacional se refleja en el descenso de la existencia de vacas. De los 24 millones de vacas del año 2007 existen hoy 21 millones de cabezas. Las pérdidas por la sequía fueron serias en todo el país (Rearte, 2010).

Los trabajos realizados sobre las causas del aborto en el ganado bovino en el país coinciden en que la mayoría de las causas son infecciosas (Campero et al., 1994, Campero et al., 2003, Campero et al., 2005), siendo la más importante la brucelosis y en

segundo lugar la campylobacteriosis (Campero et al., 2003, Costa et al., 2004). Otros agentes como *Leptospira spp.* han sido diagnosticados en forma variable condicionada su mayor frecuencia al aumento de las precipitaciones y condiciones de temperatura adecuadas con presentación regional (Draghi et al., 2006; Di Paolo et al., 2007).

Durante el ciclo reproductivo del bovino se pueden presentar diversas pérdidas prenatales y posnatales: en el servicio, en la concepción, durante el período embrionario (mortalidad embrionaria), fetal (abortos) y neonatal. El período embrionario se extiende desde la concepción hasta el momento de la diferenciación, la cual ocurre aproximadamente a los 45 días de gestación. El período fetal abarca desde el momento de la diferenciación hasta el parto. Sin embargo, se considera **aborto** la expulsión de un feto no viable hasta el día 260 de gestación. Desde dicho periodo hasta el parto se lo denomina **prematuro**, ya que el ternero estaría en condiciones de vivir fuera del útero (Miller, 1986, Dubovi, 1994). El nacimiento de un ternero a término pero muerto se lo denomina **natimorto**. Las pérdidas **neonatales** ocurren desde el nacimiento hasta los primeros 28 días de vida, y se lo puede dividir en período hebdomadal (1 a 7 días) y posthebdomadal (8 a 28 días) (Comité on Bovine Reproductive Nomenclature, 1972). La mayoría de estas pérdidas reproductivas ocurren durante el período embrionario (Vanroose et al., 2000; Jonker, 2004, Diskin and Morris, 2008) y se estiman entre un 20 % a 40 % (Dunne et al., 2000). Por otro lado, se considera que pueden ocurrir hasta un 5 % de abortos desde el diagnóstico de la preñez hasta el parto siendo común dichas pérdidas en el bovino (Jonker, 2004).

Existen varios estudios (Miller, 1986, Grôhn et al., 1990, Jamaluddin et al., 1996) que demuestran que el aborto bovino es de origen multifactorial y por lo tanto debería ser considerado como un síndrome (Gâdicke and Monti, 2008). Pero a los fines prácticos, la etiología de las pérdidas reproductivas se han clasificado en tres categorías: de origen genético, ambiental o infeccioso (Miller, 1986, Grimard et al., 2006). Las causas de origen genético incluyen anomalías de los cromosomas o de los genes. La mayoría de ellas escapan a la capacidad diagnóstica de rutina, excepto cuando el defecto es muy evidente y se conoce su carácter hereditario. Las causas de origen ambiental, son las menos estudiadas y no claramente definidas. Se mencionan abortos de origen traumático, tóxicos, por pesticidas, hormonales, nutricionales (carencias minerales y vitamínicas), exceso de nitratos, temperaturas elevadas, factores mecánicos (torsión uterina, compresión del cordón umbilical), etc. Sin embargo, es difícil encontrar evidencias experimentales que aporten un diagnóstico sólido. La última categoría es la

que comprende abortos y expulsión prematura asociados con infecciones de la madre o de la unidad feto-placenta. Si bien la mayoría de los diagnósticos del aborto bovino son atribuidos a causas infecciosas (Kirkbride, 1992, VIDA, 2000, 2001, Campero et al., 2003, Anderson, 2007) esto no significa que sean las más importantes, ya que probablemente causen menos de la mitad del total de las muertes fetales (Barr and Anderson, 1993); sin embargo, las causas de origen infeccioso son las que se diagnostican con mayor frecuencia, siendo las causas bacterianas las más frecuentes (Anderson et al., 1990, Kirkbride, 1993, Jamaluddin et al., 1996, VIDA, 2008).

### 1.3. PLACENTA

Las funciones principales de la placenta son proveerle al feto los nutrientes necesarios y realizar el intercambio gaseoso. A su vez éste tejido tiene la capacidad de reconocer al feto como “propio” mediante la implementación de complejos mecanismos inmunológicos (Entrican, 2002, Sammin et al., 2009), siendo este paso esencial para llevar adelante la gestación.

La estructura placentaria difiere entre las especies, sin embargo, existen dos características muy particulares que permiten clasificar los distintos tipos de placenta:

A) Forma de la placenta y distribución de los sitios de contacto entre las membranas fetales y el endometrio. En el caso de los bovinos la placenta es cotiledonaria múltiple, porque hay varias áreas de contacto entre la porción fetal (cotiledón) y materna (carúncula) que forman una estructura denominada placentoma.

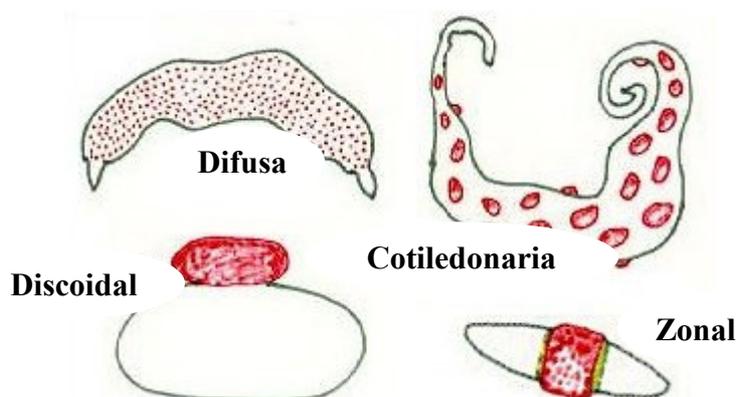


Fig. 1. Tipos de placenta en base a la forma y zonas de contacto entre la parte materna y fetal.

B) Número de capas de los tejidos que separan el sistema vascular materno del sistema vascular fetal. En el bovino, la placenta es epiteliocorial porque la totalidad de las 6

capas se mantienen durante la placentación (Fig. 2); mientras que en otras especies algunas de estas capas desaparecen durante este proceso recibiendo el tipo de placentación distintas denominaciones (Fig. 3).

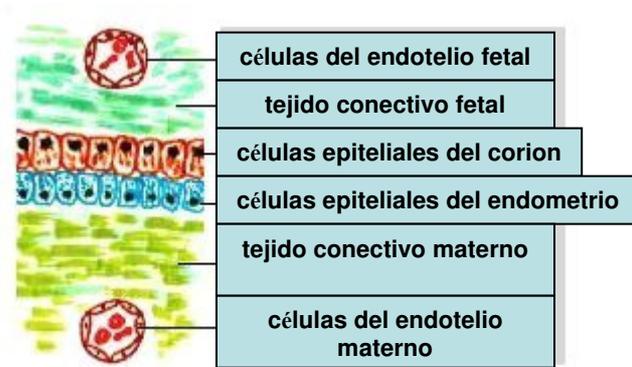


Fig. 2. Distintas capas de la placenta que separan el sistema vascular materno del sistema vascular fetal.

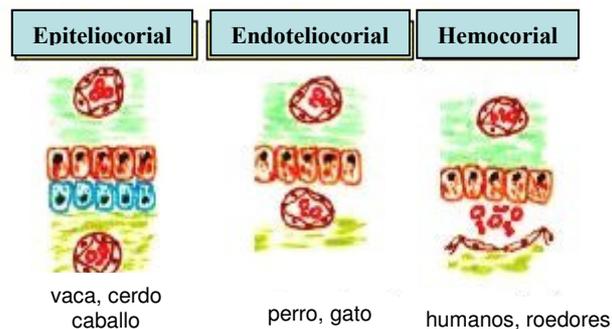


Fig.3. Clasificación placentaria en base al número de capas que separan el sistema vascular materno del sistema vascular fetal.

#### 1.4. PATOGENIA DEL ABORTO BOVINO

La patogenia del aborto bovino presenta variaciones dependiendo del agente infeccioso involucrado. Los microorganismos pueden invadir directamente la unidad fetoplacentaria o afectar indirectamente la preñez y provocar el aborto (Miller et al., 1982). Cualquier causa que produzca fiebre en la madre como mastitis, neumonías o las endotoxemias, son ejemplos de éste último caso (Miller et al., 1982).

Solo para mencionar algunas de las puertas de entrada para agentes más frecuentes se citan algunos ejemplos: a) Conjuntiva o mucosa nasal: *Herpesvirus Bovino* b) Cavidad oral, conjuntiva y piel: *Leptospira spp.* y *Brucella abortus* c) Vagina

y cuello del útero: *Campylobacter fetus*, *Tritrichomonas foetus* y *Arcanobacterium pyogenes*. d) vía sistémica: si bien *Campylobacter fetus* susp. *fetus* es un habitante del tracto intestinal del bovino, en condiciones determinadas de la gestación ya sea por inmunosupresión materna o exacerbación de la patogenicidad, puede ser captado por las células "M" de las placas de Peyer en el intestino delgado, provocar septicemia y cruzar la barrera placentaria para invadir al feto y producir el aborto, usualmente al 5-6 mes de gestación (Campero, datos sin publicar).

Una vez que los microorganismos llegan a la placenta, factores propios del tejido (como menor tensión de oxígeno y nutrientes) y del feto (escasa inmunidad humoral y celular) pueden contribuir a su crecimiento y sobrevivencia (Corbeil and Eades, 1973, Enright and Osburn, 1981). Luego del desarrollo de la placentitis, los agentes infecciosos invaden el feto a través del fluido amniótico o por la vía circulatoria (cordón umbilical).

En las infecciones severas con severo daño placentario se produce estrés fetal y como consecuencia de ello, aumenta la hormona adrenocorticotrófica fetal (ACTH) de la glándula pituitaria del feto. La ACTH actúa sobre la glándula adrenal del feto incrementando la concentración de cortisol fetal (Osburn and Kennedy, 1981). Los corticoides atraviesan la placenta y estimulan en el útero la producción de prostaglandinas  $F_{2\alpha}$ , que lisan el cuerpo lúteo disminuyendo los niveles de progesterona en la circulación materna. Las prostaglandinas  $F_{2\alpha}$  estimulan la contracción del miometrio y a su vez activa receptores para la oxitocina, resultando este proceso en la expulsión del feto (Osburn and Kennedy, 1981). Por otro lado, en el feto con hipoxia, se produce una redistribución de la corriente sanguínea hacia los órganos más vitales (cerebro) y la oxigenación se ve disminuida en los órganos menos vitales como el intestino. Como consecuencia de ello, se produce una vasoconstricción en el intestino que induce a un aumento del peristaltismo y se libera meconio en la cavidad amniótica que tiñe las superficies más expuestas. En esta etapa, el feto se encuentra en un estado de "estrés compensatorio" con buenos niveles de oxigenación en los órganos vitales e hipoxia periférica. Si la hipoxia continúa, el feto comienza a tener movimientos respiratorios violentos y espasmódicos que lo hacen inhalar líquido amniótico hacia los pulmones, resultando este proceso en la presencia de meconio en bronquiolos y alvéolos y eventual bronconeumonía incompatible con la vida extrauterina (Miller et al., 1982, Lopez and Bildfell, 1992). Existen otras causas de hipoxia fetal además de la placentitis

de origen infeccioso, como falla en la circulación materna, disturbios en la transferencia de oxígeno por neumonías, compresión del cordón umbilical, parto distócico, etc.

Las lesiones observadas en la piel (dermatitis) son típicas de las infecciones micóticas producidas por *Aspergillus fumigatus*, en donde el hongo invade al feto contaminando el fluido amniótico que lo rodea. En cambio, cuando el agente infeccioso invade al feto por la vía circulatoria (cordón umbilical), el principal órgano afectado es el hígado. Son ejemplos el Herpesvirus Bovino (HVB), la infección por *Listeria monocytogenes* o *Campylobacter fetus* produciendo necrosis multifocal hepática (Campero et al., 2005). A su vez, las lesiones en el pulmón fetal del tipo de neumonía intersticial son muy frecuentes (Lopez et al., 1989) y pueden deberse a una infección sistémica o por la inhalación de líquido amniótico que contiene microorganismos (Lopez and Bildfell, 1992).

Según Miller y Quinn (1975), los lugares más frecuentes en donde se encuentran las lesiones microscópicas en el feto son la placenta, pulmones y el hígado. Sin embargo, en la determinación del sitio de injuria no solo influye la vía de entrada de los agentes infecciosos; también existen otros factores como la etapa del desarrollo embrionario y la inmunidad fetal al momento de la exposición.

Esta interacción está muy bien caracterizada con el virus de la Diarrea Viral Bovina (vDVB) (Moennig and Liess, 1995) en la cual el daño variará según la etapa de la gestación en la cual ocurra la infección fetal. Si la infección ocurre en el primer trimestre de la gestación suele provocar el aborto, reabsorción o momificación fetal; si sucede entre los 100 y 150 días de gestación, los hallazgos más frecuentes son la necrosis del epitelio de la piel, degeneración de la retina e hipoplasia cerebelar y luego de los 170 días de gestación el feto es inmunocompetente al virus, con lo cual las lesiones son mínimas o están ausentes.

### **1.5. INMUNIDAD FETAL Y MATERNA DURANTE LA GESTACION**

En el feto bovino, las células madres se originan en el saco vitelino y migran hacia el hígado, lugar en el cual se desarrollan. Luego se dirigen hacia el timo y a la médula ósea, en donde maduran y se diferencian en linfocitos T y B, respectivamente (Schultz, 1973, Osburn, 1982). Finalmente, ambos tipos de células se dirigen hacia los órganos linfáticos secundarios (linfonódulos y el bazo) donde se localizan en los sitios anatómicos específicos. Los linfocitos T son los responsables de la inmunidad celular;

mientras que los linfocitos B son las células encargadas de producir anticuerpos (inmunoglobulinas) frente a un estímulo antigénico apropiado (Osburn, 1973, 1982).

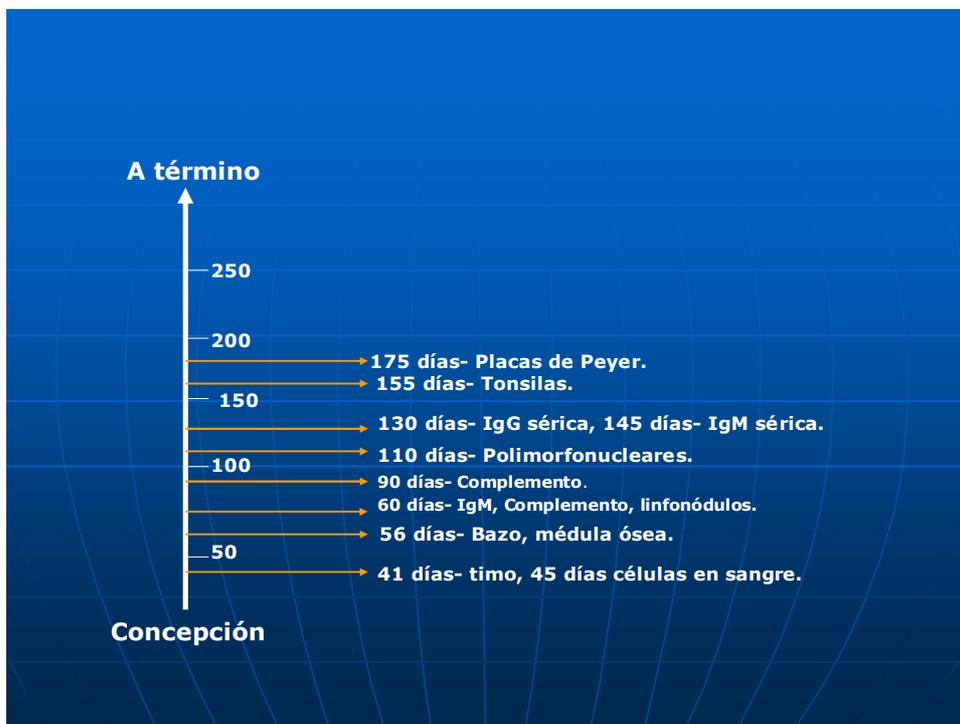


Fig.4. Desarrollo del sistema inmunitario bovino (adaptado de Tizard, 1996).

En los bovinos, el tipo de placenta cotiledonaria epiteliocorial (Entrincan, 2002) sirve como barrera evitando el pasaje de las inmunoglobulinas (Igs) maternas hacia el feto y de esta manera el mismo permanece hipoglobulinémico hasta el momento en que recibe el calostro luego del nacimiento (Brambell, 1958). Sin embargo, el feto bovino es capaz de responder inmunológicamente a diversos microorganismos a partir de los 90-110 días de gestación (Enright and Osburn, 1981). Los títulos más altos de anticuerpos se obtienen en los fetos que abortan en el último tercio de la gestación, debido a que la respuesta inmune es más eficiente a medida que avanza la gestación (Osburn, 1973).

Diferentes trabajos determinaron la concentración de Igs específicas en respuesta a distintos agentes infecciosos y sustancias en fetos bovinos abortados espontáneamente (Kendrick, 1971; Kirkbride et al., 1973, Jensen et al., 1988, Bartley et al., 2003, Moore et al., 2003). Casaro et al., (1971) y otros autores (Braun et al., 1973, Brown et al., 1979) demostraron que el feto bovino es inmunológicamente competente al vDVB aproximadamente a los 100 días de gestación. Mientras que en el caso de *B. abortus* los primeros anticuerpos neutralizantes se detectaron a partir de los 180 días de gestación o más (Schultz, 1973). Como se mencionó previamente, el momento en el cual ocurre la

infección fetal es crítica. Para el caso de *Neospora caninum*, si la infección sucede en la gestación temprana la consecuencia es fatal debido a que el sistema inmune del feto está inmaduro y no puede impedir la infección resultando en el aborto (Dubey et al., 1992, Williams et al., 2000, Macaldowie et al., 2004, Maley et al., 2006). En cambio si la infección ocurre durante la gestación avanzada, el feto es capaz de responder inmunológicamente y los terneros nacen clínicamente normales aunque congénitamente infectados (Wouda et al., 1997, Innes et al., 2001, Williams et al., 2003).

Durante el período de la gestación, intervienen una serie de mecanismos hormonales, inmunológicos y fisiológicos (Szekeres-bartho, 2002). La madre gestante adapta su metabolismo y su sistema inmune proporcionando un medio homeostático al concepto. Asimismo, la preñez está condicionada por mecanismos complejos de tolerancia y rechazo (Hansen, 1997, Thellin and Heinen, 2003) en el cual las citoquinas juegan un papel crucial tanto en la interfase materno-fetal como en la periferia (Entrican, 2002). Los altos niveles de progesterona presentes en la gestación favorecen la respuesta inmune Th2 (linfocitos helper tipo 2) la cual favorece el mantenimiento de la preñez. Para ello produce interleuquinas (IL4, IL5, IL6, IL9, IL10) mientras que se reduce la producción de moléculas proinflamatorias como IL12 e interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) los cuales no son convenientes para la vida fetal (Clark et al., 1999, Raghupathy, 1997, Entrican, 2002).

Uno de los mecanismos más importantes de rechazo del feto involucra un desbalance entre la respuesta linfocitaria Th1/Th2 a favor de los linfocitos Th1 y de la producción de IFN- $\gamma$  y otras citocinas asociadas a este tipo de respuesta (Hill et al., 1995, Raghupathy, 1997). Las interleuquinas IL2, IL3 e IL12 promueven la actividad citolítica en los macrófagos y en las células natural killer (NK), además activan la protrombina facilitando la coagulación y la trombosis y estimulan la producción de Igs que activan la cascada del complemento. Las infecciones que promueven una respuesta Th1, como en el caso de *N. caninum*, alteran el sincitio trofoblástico ya que el IFN- $\gamma$  es capaz de actuar directamente sobre este tejido induciendo abortos espontáneos (Clark et al., 1999, Clark and Croitoru, 2001).

## **1.6. CARACTERIZACIÓN DIAGNÓSTICA DEL ABORTO BOVINO**

El diagnóstico etiológico del aborto bovino resulta un desafío tanto para el veterinario como para el laboratorista por su relativa baja eficiencia (Evermann et al.,

1982, Kirkbride et al, 1990, Campero et al., 2003, Anderson 1990, Anderson 2007). Existe una gran variedad de causas, la mayoría asociada a un número limitado de agentes infecciosos (Hubbert et al., 1973, Corbellini et al., 2006, Anderson 2007, BonDurant, 2007) aunque probablemente una elevada proporción de abortos de origen no infeccioso estén implicados, estas pérdidas son difíciles de establecer (Villar 1979, Wren 1999). La proporción del aborto bovino atribuida a un agente abortigénico específico puede variar según la región probablemente debido a diferencias en el clima, alimentación, prácticas de manejo, programas de vacunación, etc. La calidad de las muestras remitidas y los protocolos de trabajo de cada laboratorio también pueden influir en la identificación de ciertos agentes abortigénicos (Dennis et al., 1980, Miller et al., 1982, Thurmond and Anderson, 1994). La implementación de técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en algunos laboratorios, ha mejorado el diagnóstico del aborto por *N. caninum* (Baszler et al., 1999).

A pesar que los abortos pueden ocurrir en cualquier período de la gestación, los mismos son más fáciles de detectar en el segundo y tercer trimestre probablemente debido a la dificultad para encontrar fetos abortados en periodos previos (Evermann et al., 1982). Este hecho influiría en la estimación de la edad gestacional promedio de los fetos abortados (Thurmond, 1994). Existen pocos signos clínicos para el diagnóstico del aborto y es raro encontrar lesiones macroscópicas o microscópicas características de algún agente abortigénico en particular debido al proceso de autólisis fetal (Kirkbride, 1985, 1986).

Por ello se requiere de un trabajo completo y sistemático que involucren los antecedentes del rodeo y procedimientos de patología, microbiología, virología e inmunología (Jerret et al., 1984, Murray, 2006). La anamnesis del rodeo problema, vacunaciones o ingreso de animales, movimientos de encierres, presencia de abortos en determinadas categorías de animales, porcentaje de abortos y enfermedades previas, edad gestacional de los abortos, estado de los fetos (frescos o autolíticos), si se realiza servicio natural o artificial, etc, pueden ayudar a caracterizar el diagnóstico (Mickelsen et al., 1994).

Muchas veces cuando no existen signos específicos o lesiones para decidir que test utilizar, en base a ello los laboratorios emplean protocolos de diagnóstico estandar. El envío del feto con la placenta y sueros maternos de animales abortados y no abortados son los mejores elementos; cuando es factible se recomienda remitir muestras

de más de un feto. La placenta es un órgano clave que ayuda a la caracterización del aborto donde la lesión primaria se encuentra en éste órgano (Mc Clausland et al., 1987, Johnson et al., 1994).

El examen del feto y la placenta en la necropsia debe ser completo (Kirkbride 1986). Se deberá considerar alguna lesión visible, el grado de autólisis dado que el feto muerto queda retenido en el útero usualmente varios días y los tejidos sufren autólisis, se embeben con hemoglobina caracterizando un exudado serohemorrágico en las cavidades. Es importante además estimar la edad fetal midiendo al feto desde la base de la nuca hasta la base de la cola y registrar la presencia de pelo y su distribución en el cuerpo. Se deberán tomar muestras de todos los órganos (cerebro, pulmón, corazón, hígado, riñón, adrenales, bazo, timo, nódulos linfáticos, músculo esquelético, abomaso, intestino y placenta) para el posterior análisis histopatológico (Miller and Quinn, 1975, Miller et al., 1990). El examen bacteriológico de rutina incluye el cultivo de órganos varios (pulmón, hígado y fluido abomasal) para el aislamiento de organismos aeróbicos y microaerófilos (Campero et al., 1994). Con el contenido abomasal se pueden realizar tinciones específicas para identificar agentes como *B. abortus* o *C. fetus fetus*, también es adecuado para realizar inmunofluorescencia directa (IFD) para diagnóstico de Campylobacteriosis (Campero et al., 2003) y cultivos para aislamiento de *T. foetus* (Campero et al., 1986). Las improntas de órganos como hígado, riñón y pulmón para realizar IFD e identificar la presencia de organismos como *Leptospira spp.* (Smith et al., 1994) resulta una herramienta diagnóstica de importancia. También se pueden efectuar cultivos para hongos a partir de piel, placenta, fluido abomasal, pulmón ya sea de rutina o bien cuando las lesiones groseras en el postmortem en piel o placenta así lo sugieran (Jonson et al., 1994). Para el aislamiento viral algunos laboratorios utilizan un pool de tejidos como bazo, ganglio, hígado, pulmón, riñón, (Kirkbride, 1992b) otros protocolos se limitan a identificar el vDVB y el HVB mediante la técnica de IFD en muestras congeladas de pulmón (o hígado) y riñón fetal (Jamaluddin et al., 1996).

La serología materna y fetal son herramientas importantes para el diagnóstico del aborto (Thurmond et al., 1990c). El envío de una sola muestra de suero de la vaca abortada puede ayudar a determinar la exposición, o falta de exposición, a uno o varios agentes infecciosos, pero usualmente no permite determinar si ocurrió exposición natural o vacunal, o bien exposición previa o reciente. Las muestras de suero pareadas de casos agudos y convalecientes son necesarias para identificar si hubo un aumento significativo de títulos hacia determinado microorganismo en particular. Sin embargo,

la seroconversión materna de un agente abortigénico puede preceder al aborto, por ende el suero obtenido antes y durante el aborto, no siempre demuestran un aumento en los títulos. La serología materna es más útil cuando se examina el suero de un animal no vacunado o cuando se muestrean muchos animales de los cuales se posee una historia clínica detallada. Finalmente, los resultados serológicos en casos de abortos deben analizarse con sumo cuidado, pues éstos dependerán de la prevalencia de la infección en una determinada área y de la persistencia de los anticuerpos en el animal (Wolfgang, 2003<sup>ab</sup>) como también de la sensibilidad y especificidad de la prueba.

En el feto, las pruebas serológicas dependen de la condición post-mortem y de la edad fetal (Kirkbride et al., 1977). Se puede realizar serología fetal para vDVB, HVB, *Leptospira spp.* y *N. caninum* a partir de los fluidos de cavidad torácica y/o abdominal (Kirkbride and Jonson, 1989, Moore et al., 2003, Odeón et al., 2003). Cuando el título serológico a un determinado agente infeccioso está elevado sugiere que el feto estuvo expuesto a dicho agente. A veces pueden obtenerse bajos títulos de anticuerpos fetales de más de un agente infeccioso, sin evidencia de infección y en estos casos se debe ser cauteloso en la interpretación de los resultados, debido a que los anticuerpos maternos pueden atravesar la placenta lesionada y llegar al feto (Moore et al., 2003, Anderson 2007).

El veterinario debe remitir al laboratorio el feto entero refrigerado y en situaciones en la que no es posible, debería enviar muestras frescas y en formol. Las muestras frescas refrigeradas (no congeladas) deben incluir: pulmón, hígado, riñón, contenido de abomaso estéril, fluido de cavidades, suero materno y placenta. Las muestras en formol son las mismas que se utilizan para el análisis histopatológico mencionado previamente.

Finalmente el veterinario de campo deberá establecer si el diagnóstico identificado en el laboratorio de un posible agente abortigénico es válido con las pérdidas reproductivas presentes en el rodeo y para ello deberá realizar una investigación epidemiológica que incorpore una serie de evidencias (Gâdicke and Monti, 2008)

## **1.7. CAUSAS INFECCIOSAS DE ABORTO BOVINO**

### **1.7.1. Bacterias**

#### 1.7.1.1. *Brucella abortus*

*B. abortus* es responsable de una de las infecciones zoonóticas de mayor distribución en el mundo (OIE 2008, Boschioli et al., 2001, Seleem et al., 2010) y se caracteriza principalmente por producir abortos en el último tercio de la gestación en bovinos y enfermedad febril recurrente en el hombre (Samartino et al., 1993). La brucelosis es una enfermedad endémica en muchos países (Baumgarten 2002, Francisco et al., 2002, Godfroid et al., 2002, McDermott et al., 2002, Padilla Poester et al., 2002, Samartino et al., 2002, Vargas and Francisco, 2002, Renukaradhya et al., 2002, Ocholi et al., 2004, Lee et al., 2009, Seleem et al., 2010) aunque su prevalencia ha disminuído por los programas oficiales de vigilancia y control (Godfroid et al., 2002). En Argentina la seroprevalencia de brucelosis bovina se estima en rodeos para cría en 2-3% (Samartino et al., 2002), siendo variable según regiones del país, en los rodeos lecheros es menor (1-1,5%) (Campero, 2000; Samartino et al., 2002, Robles, 2003).

En el género *Brucella* se han identificado 6 especies con sus respectivas biovars, causantes de enfermedad en los animales y en el hombre: *B. abortus* (7 biovars), *B. melitensis* (3 biovars), *B. suis* (5 biovars), *B. ovis*, *B. canis* y *B. neotomae* (Bricker, 1994; Bricker, 2002). En los últimos años se han aislado especies de *Brucellas* en mamíferos marinos, conociéndose dos nuevas especies, denominadas *B. pinnipediae* y *B. cetaceae* (Foster et al., 2002).

*B. abortus* es un cocobacilo pequeño, Gram negativo, intracelular facultativo (Nicoletti, 1990) y tiene la propiedad de sobrevivir y multiplicarse en las células fagocíticas del sistema inmune (Nicoletti, 1990, Carvalho Neta et al., 2010). Este comportamiento está estrechamente relacionado con la estructura y fisiología de la bacteria (Celli, 2006).

Estos microorganismos penetran a través de las membranas mucosas; siendo la vía de entrada más común la cavidad oral, en la cual se produce una reacción inflamatoria en los linfonódulos regionales (Nicoletti, 1990). Si el sistema inmune no logra destruirlas se produce una bacteriemia y se dispersa hacia otros órganos, principalmente ganglios linfáticos, ubre y útero grávido. La bacteria tiene una marcada predilección por el trofoblasto placentario donde se replica y acumula en gran número (Alexander et al., 1981, Anderson et al., 1986, Samartino et al., 1993, Silva et al., 2005). Este proceso provoca una placentitis crónica con posterior infección y muerte fetal, la cual ocurre en el último tercio de la gestación. La principal fuente de infección para el rodeo es la vaca infectada que aborta, dado que elimina millones de bacterias al medio

ambiente con el feto, la placenta, los fluidos fetales, loquios y flujo vaginal (Anderson et al., 1986). La infección está influenciada por factores inherentes al huésped (edad, sexo, estado fisiológico), al agente infeccioso (dosis, patogenicidad y virulencia) y a factores externos (manejo y medio ambiente) (Nicoletti, 1980, Adams, 2002).

La lesión patológica más consistente en el concepto es la placentitis con edema y necrosis del trofoblasto y de áreas intercotiledonarias. Histológicamente se observa una placentitis severa con numerosas bacterias visibles en las células epiteliales coriónicas; mastitis, metritis e hiperplasia linfoidea en linfonódulos y bazo (Meador et al., 1988, Xavier et al., 2009). El feto frecuentemente se encuentra autolítico y a veces con exudado fibrinoso en la cavidad torácica. Microscópicamente, la bronconeumonía es la lesión principal, la cual es bastante inespecífica pudiendo variar desde una bronconeumonía aguda neutrofílica hasta neumonía intersticial crónica con infiltrado mononuclear (López et al., 1989, Meador et al., 1988, Xavier et al., 2009).

Existen varias técnicas para confirmar el diagnóstico de la enfermedad; sin embargo, la prueba clásica es el aislamiento bacteriano en medios selectivos de cultivo (Hornsby et al., 2000, Bricker, 2002) a partir de órganos y fluidos fetales y maternos (fluido abomasal, pulmón, placenta, fluidos uterinos, calostro y leche) (Corner et al., 1982). También se puede demostrar la presencia de *Brucellas* en los frotis mediante la tinción de Ziehl Nielsen modificada y en improntas aplicando la técnica de IFD (Sandhu et al., 1986). La prueba de inmunohistoquímica (IHQ) puede utilizarse para detectar la bacteria en diversos órganos infectados (Meador et al., 1986, Xavier et al., 2009).

Para identificar los animales infectados en un rodeo se recurre a las pruebas serológicas como BPA, ELISA, 2-mercaptoetanol y fijación de complemento (Saraví et al., 1995, Nielsen et al., 1995, Nielsen et al., 1996, Uzal et al., 1996). Otra técnica implementado últimamente es PCR por su alta sensibilidad, especificidad y rapidez (Bricker et al., 2002, Padilla et al., 2003). Varias regiones del genoma de *Brucella* se han empleado para realizar PCR (Leary et al., 2006); permitiendo identificar al agente infeccioso en tejidos fetales (Cetinkaya et al., 1999, Cortez et al., 2001) y maternos (Fekete et al., 1992, Gallien et al., 1998).

#### 1.7.1.2. *Campylobacter fetus*

La campylobacteriosis genital bovina es una enfermedad venérea siendo su agente causal *C. fetus* con sus variedades *venerealis* (incluido el biotipo *intermedius*) y *fetus* (Campero, 2005). Otras especies relacionadas con *C. fetus* son: *C. fetus* subespecie

*intestinalis* y *C. fetus* subespecie *jejuni*; ambas pueden provocar abortos ocasionales por infección materna de origen intestinal (Hoffer, 1981). La campylobacteriosis se caracteriza por producir en la hembra infertilidad temporaria, mortalidad embrionaria y abortos a partir de los cuatro meses de gestación (Hoffer, 1981; Hum, 1987, Eaglesome and García 1992; BonDurant, 2005; Campero et al., 2005). En el macho, *C. fetus* se acantona en la mucosa del pene y prepucio produciendo infección crónica asintomática sin afectar su libido ni la fertilidad (Hoffer 1981; García et. al., 1983). La infección puede ser introducida en un rodeo mediante el ingreso de toros infectados, adquisición de vacas o vaquillonas de las cuales se desconoce su status sanitario o bien por la presencia de vacas portadoras asintomáticas (Campero, 2005). Algunas hembras desarrollan rápida inmunidad en el tracto reproductivo luego de la infección pudiendo concebir sin dificultad (Hoffer, 1981). Otras vacas pueden permanecer como portadoras crónicas del organismo durante meses, llevando incluso su preñez a término y seguir infectadas de un servicio a otro (Hoffer, 1981; Campero, 2005).

Las hembras que han estado previamente infectadas son más refractarias a la reinfección debido a la memoria inmunológica generada en el tracto reproductivo (Clark, 1971). Durante el estro, la bacteria coloniza el área cervicovaginal e invade el útero durante la fase progestacional (Schurig et al., 1974). La abundante cantidad de neutrófilos observada durante la fase estral evitaría la colonización de *C. fetus* hacia el útero (Corbeil et al., 1975). El diagnóstico de la enfermedad se puede realizar mediante la extracción de muestras prepuciales en los toros, el examen del mucus cervicovaginal (MCV) en las vacas vacías o abortadas o el examen de la placenta y feto realizándose cultivo bacteriológico y /o IFD (Ellis, 1990;; Hoffer, 1981; Hum et al., 1991). También se utiliza la IHQ en tejidos fetales bovinos y ovinos (Campero et al., 2005<sup>a</sup>) con lesiones histopatológicas (Campero et al., 2003; Anderson et al., 2007). En la actualidad existe una gran heterogeneidad en los métodos de diagnóstico utilizados para detectar e identificar al agente causal de la campylobacteriosis bovina (Hoffer, 1981; Van Bergen et al., 2005). Por un lado, el aislamiento de la bacteria resulta difícil (Clark 1971, Eaglesome and García 1992, Hum et al., 1994) por otro lado, la clasificación fenotípica de *C. fetus* mediante el uso de los test convencionales han arrojado resultados erróneos (On et al., 1996, Hum et al., 1997). El test de IFD se utiliza ampliamente para el diagnóstico de la enfermedad en muestras prepuciales y de MCV (Campero, 2000; Cipolla et al., 1995<sup>a</sup>; Cobo et al., 2003). En un trabajo realizado recientemente (Ferreira Figueiredo et al., 2002) se efectuó la IFD en muestras prepuciales, obteniéndose una

elevada sensibilidad (92,6%) y especificidad (88,9%), respectivamente. Finalmente, la técnica de PCR se ha empleado en los últimos años para la detección de las subespecies de *C. fetus* (Hum et al., 1997, Schulze et al., 2006, Vargas et al., 2003, Wagenaar et al., 2001, Willoughby et al., 2005), obteniéndose resultados aceptables en algunos casos y contradictorios en otros.

### 1.7.1.3. *Leptospira* spp.

La leptospirosis es una zoonosis de distribución mundial que afecta a los mamíferos tanto domésticos como silvestres, aunque el agente se ha aislado de otros vertebrados, como aves y anfibios (Alonso-Andicoberry et al., 2001). El género *Leptospira* se divide en dos especies: *L. interrogans* que incluye a las leptospirosis patógenas y *L. biflexa* donde se encuentran las leptospirosis saprófitas (Ellis, 1994). En varios países se han realizado estudios determinando la seroprevalencia de la enfermedad en el ganado bovino (Bercovich, 1986; Dragui et al., 1986; Gaumont and Trap, 1986; Riedeman et al., 1986; Langoni et al., 1999; Espí et al., 2000; Alonso-Andicoberry et al., 2001) y los serovares predominantes de cada región.

En el ganado bovino *L. hardjo* y sus genotipos (Hardjobovis y Hardjoprajitno) están adaptadas al huésped y son responsables de abortos, nacimiento de terneros débiles y problemas de infertilidad en el rodeo (Ellis, 1994; Leonard, 1995; Givens, 2006; Anderson, 2007), mientras que *L. pomona* y otros serovares que no están adaptados al bovino provocan infecciones accidentales (Ellis, 1994). Existen ciertas condiciones que favorecen la sobrevivencia de las leptospirosis fuera del hospedador como la humedad, suelos anegadizos con pH neutro o ligeramente alcalino y temperaturas medias (Levett, 2001). La transmisión de la enfermedad ocurre por contacto con la orina infectada, descargas uterinas post-aborto, placenta, contacto sexual y material infectado (agua, pasto). Estas bacterias son capaces de penetrar por las membranas mucosas intactas (nasal, genital, ocular) o la piel erosionada y producen leptospiremia. La misma declina gradualmente con la aparición de IgM y posteriormente IgG.

Los signos clínicos dependen del serovar y el huésped actuante (Heath and Jonson, 1994). En la leptospirosis aguda los principales signos incluyen fiebre, anemia hemolítica, hemoglobinuria, ictericia y alta tasa de mortalidad en el ganado joven. En la leptospirosis crónica, el aborto es el único signo que se observa en el rodeo. En las vacas lactantes puede observarse agalactia y mastitis con ubres flácidas y secreción

amarillenta o sanguinolenta (Heath and Jonson, 1994). El aborto se produce porque en la fase de leptospiremia las bacterias atraviesan la placenta y llegan al feto causando su muerte (Fennestad and Borg-Petersen, 1958). Los abortos por *L. hardjo* pueden ocurrir en cualquier estadio de la gestación variando desde 3-10% en los rodeos endémicos, mientras que los abortos por *L. pomona* usualmente ocurren en el último trimestre de la gestación pudiendo alcanzar hasta un 30% (Ellis, 1994; Health and Jonson, 1994). La mayoría de las leptospiras se localizan y persisten en los túbulos proximales de los riñones y luego se excretan por orina en forma intermitente (Ellis, 1994; Givens, 2006). El feto abortado en general se encuentra autolítico y presenta ictericia (Anderson, 2007) y las lesiones histológicas pueden ser leves o estar ausentes (Skilbeck et al., 1988). El bovino adulto se transforma en un portador inaparente con eliminación intermitente por orina ocasionando nefritis intersticial relacionada con la presencia del antígeno.

La *Leptospira* puede ser demostrada por IHQ (Yener and Keles, 2001, Temur et al., 2003, Rossetti et al., 2004, Ellis et al., 1983, Saglam et al., 2008). Asimismo, se han empleado conjugados multivalentes para la IFD (Miller, 1989). Con dicha técnica se han detectado leptospiras en improntas de tejidos fetales (Ellis et al., 1982); sin embargo la desventaja de esta técnica es que posee es la relativa baja especificidad y sensibilidad (Ellis et al., 1982; Ellis et al., 1983).

El aislamiento de la bacteria resulta costoso, poco práctico y lento, por ello no se realiza de rutina (Ellis, 1990; Smith et al., 1994). El aislamiento a partir de tejidos fetales es difícil por la frecuente autólisis (Ellis et al., 1982; Smith et al., 1994). El test de microaglutinación (MAT) es el que se ha utilizado con mayor frecuencia para el diagnóstico en bovinos (Smith et al., 1994). Sin embargo, se debe ser cauteloso al diferenciar los títulos serológicos producidos por infecciones naturales versus títulos vacunales (Hanson, 1973; Health and Jonson, 1994; Smith et al., 1994). Por otro lado, este test ha permitido identificar distintos serovares de leptospira en suero fetal siendo este hecho indicativo de una infección en el feto (Ellis et al., 1978; Ellis et al., 1982, Moore et al., 2003). La detección de leptospiras en muestras de orina utilizando PCR, es altamente específica y sensible (Van Eys et al., 1989; Gerritsen et al., 1991; Quaresma-Bomfim et al., 2007, Lilenbaum et al., 2008) permitiendo identificar en muchos casos la serovar específica. Además, se ha realizado PCR en muestras provenientes de tejidos fetales bovinos (Bolin et al., 1999; Richtzenhain et al., 2002) obteniéndose en estos casos resultados favorables.

#### 1.7.1.4. *Bacterias oportunistas*

Existe un grupo de agentes bacterianos asociados a infecciones oportunistas de la placenta y el feto que provocan abortos esporádicos, los cuales han sido identificados por varios autores (Woelffer et al., 1972, Kirkbride et al., 1991, Kirkbride et al., 1992; Kirkbride et al., 1993, Campero et al., 1993, Campero et al., 2003, Yaeger and Holler, 2007). El primer grupo corresponde a los organismos contagiosos ubicuitarios del bovino ya sea del medio ambiente o de las superficies mucosas y generalmente no están asociados a enfermedades significantes en el animal adulto como por ejemplo *Arcanobacterium pyogenes*, *Bacillus spp*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp*. En este caso se considera que la infección llega al feto por vía hematológica y debido a que estos organismos no causan epizootias de abortos sino problemas reproductivos individuales en el rodeo, su aislamiento es de mínimo significado (Jubb et al., 1985). El otro grupo de agentes que ocasiona abortos bacterianos esporádicos está integrado por microorganismos que son patógenos para el animal adulto como *Histophilus somni*, *Pasteurella spp*, *Listeria spp*, *Salmonella spp*. En este caso, los abortos son consecuencia de la enfermedad primaria y las bacterias acceden a la unidad feto-placentaria por vía hematológica (Harris and Janzen, 1989). Se ha demostrado que la asociación de estas bacterias oportunistas con agentes infecciosos inmunosupresivos como el vDVB puede ser un factor predisponente para la presentación de los abortos esporádicos (Kirkbride et al., 1991).

En el caso *Bacillus spp*. se han identificado 2 especies que pueden causar abortos esporádicos: *B. cereus* y *B. licheniformis*. Los abortos ocurren usualmente en el último tercio de la gestación. La peritonitis y pleuritis fibrinosa frecuentemente están presentes; sin embargo, la lesión más característica (que no siempre es consistente) es la epicarditis fibrinosa (Mitchell and Barton, 1986).

En la infección por *A. pyogenes*, y *E. coli*, los fetos presentan moderada a severa autólisis y en el caso de *E. coli* pueden presentar descomposición, enfisematosos y con olor pútrido. En ambos agentes a veces se pueden observar lesiones de pleuritis, peritonitis y placentitis supurativas fibrinosas (Kirkbride et al., 1991, Kirkbride et al., 1993).

*L. monocytogenes* puede manifestarse con síntomas de encefalitis, abortos y septicemia neonatal (Anon, 1983). La bacteria se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, siendo su hábitat natural el suelo y el tracto intestinal. Bajo ciertas condiciones, como pH elevado y aerobiosis en silos mal elaborados, prolifera (Low et

al., 1997, Hassan et al., 2000). El microorganismo ingresa por vía oral, atraviesa la pared del intestino y se disemina por vía hematogena hacia el concepto causando placentitis y aborto (Low et al., 1997). A pesar que la mayoría de los abortos son esporádicos, pueden ocurrir tormentas de abortos cuando los animales consumen silos mal elaborados y de de baja calidad (Smith and Dennis, 1990). Es característica la autólisis fetal, sin embargo pueden verse en algunos casos focos miliares blanquecinos en el hígado (microabscesos). Los cambios histopatológicos incluyen hepatitis multifocal necrotizante o supurativa y placentitis supurativa (Kennedy and Miller, 1992). El diagnóstico se basa en el aislamiento de *Listeria monocytogenes* presente en tejidos fetales, contenido abomasal, placenta y descargas uterinas (Smith and Dennis, 1990). Además se puede realizar la tinción de Gram en extendidos de fluido abomasal e IHQ en tejidos (Morrell, et al., 2005, Domingo et al., 1986)

Los abortos por salmonelosis usualmente están asociados a *Salmonella Dublin* aunque pueden estar involucrados otros serotipos (Anderson et al., 2007). Se presume que la infección se origina en el tracto digestivo y luego se produce bacteriemia con localización y proliferación de la bacteria en los placentomas causando posteriormente el aborto. Los signos clínicos en la vaca no son característicos, aunque puede preceder al aborto signos de pirexia (Hall and Jones 1976). El feto casi siempre está autolítico y enfisematoso y en algunos casos pueden observarse focos puntiformes en la superficie hepática. Histológicamente se observa placentitis neutrofilica con proliferación bacteriana en los cotiledones y el hígado fetal con hepatitis multifocal supurativa (Kennedy and Miller, 1992).

Debido a que estas bacterias son comunes en el ambiente y mucosas, su presencia en los tejidos fetales puede indicar contaminación accidental. Este es el caso de *A. pyogenes* quien frecuentemente invade el útero en el período post-parto (Campero et al., 1992).

Por este motivo, para establecer un diagnóstico etiológico certero, estos microorganismos deben ser aislados en forma pura (Akcam et al., 2006) del contenido abomasal o de los tejidos y además presentar lesiones consistentes de infección bacteriana en el feto y/o placenta (Deas et al., 1981, Kirkbride et al., 1985, Barr et al., 1993). Dado el carácter esporádico de estos abortos, no existen vacunas disponibles y el control puede resultar difícil. Una adecuada nutrición y la disminución de los factores estresantes pueden reducir el número de abortos bacterianos esporádicos (Yaeger and Holler, 2007).

## 1.7.2. Virus

### 1.7.2.1. *Diarrea Viral Bovina*

El vDVB produce severas pérdidas económicas (Duffell et al., 1986, Vottero et al., 1992; Houe, 1999); observándose una elevada seroprevalencia en muchos países del mundo (Meyling et al., 1990, Niskanen et al., 1995; Carman et al., 1998, Houe, 1999, Goens, 2002) incluido nuestro país (Odeón et al., 2001). En Argentina, más del 60 % de la población de vacas adultas son seropositivas al vDVB (Rweyemamu et al., 1990, Odeón et al., 2001). Ensayos realizados en este país por Pinto et al., (1993) detectaron que un 2 % de los fetos abortados tenían títulos positivos al vDBV; mientras que Muñoz., et al (1996) hallaron una prevalencia fetal del 25 %.

El vDVB es un Pestivirus que puede transmitirse por contacto directo o indirecto entre animales, infección transplacentaria o transmisión sexual debido al semen de un toro infectado (Blood and Radostits, 1992). Existen dos biotipos del vDVB los cuales se clasifican en base a su comportamiento en cultivos celulares: el vDBV citopático (CP) produce necrosis celular mientras que el vDVB no citopático (NCP) no causa daño celular (Baker, 1987; Duvobi, 1994; Nettleton and Entrican, 1995). Ambos biotipos provocan anomalías fetales en forma similar, con la única diferencia que el virus no citopático origina terneros persistentemente infectados (Bolin, 1990). El vDVB presenta diferentes cuadros según patogenicidad y características de las cepas actuantes como la infección benigna que es subclínica. La enfermedad de las mucosas suele ser mortal y ocurre en animales con viremia persistente e inmunotolerancia específica como secuela de infección congénita adquirida al principio de la vida fetal. Otras presentaciones de la enfermedad pueden ser: anomalías congénitas al nacimiento por infecciones fetales en la mitad de la gestación; abortos, momificación, fallas en la reproducción e inmunosupresión (Brownlie et al., 1987, Dubovi, 1994; Moennig and Liess, 1995, McGowan and Kirkland, 1995, Fray et al., 2000, Grooms, 2004). Es muy importante tener en cuenta el potencial inmunosupresivo del vDVB, el cual puede incrementar la susceptibilidad hacia otros agentes infecciosos (Muñoz-Zanzi et al., 2003), siendo común la presencia de anticuerpos contra *N. caninum* y el vDVB en las vacas que han abortado.

El diagnóstico del vDVB se puede realizar detectando al virus o sus componentes estructurales, midiendo la inmunidad específica generada por el virus

mediante neutralización, ELISA o inmunofluorescencia indirecta (IFI) (Sandvic, 2005). El método más confiable y sensible que permite confirmar la presencia del vDVB es el aislamiento del agente siendo ésta prueba determinante (Edwards, 1990, Sandvik, 1999). Otro método de diagnóstico empleado es la identificación de animales persistentemente infectados (PI) mediante el cultivo de leucocitos o del suero (Sandvik, 1999) y rt-PCR a partir de muestras de suero o sangre entera (Laamanen et al., 1997, Vilcek et al., 2001). También se ha empleado la prueba de IHQ en muestras de piel (Baszler et al., 1995, Grooms and Keilen, 2002, Brodersen, 2004, Cornish et al., 2005) obteniéndose excelentes resultados debido a la sensibilidad y especificidad de la IHQ para identificar al vDVB en los animales PI.

Los test serológicos son útiles para la vigilancia epidemiológica y se los pueden utilizar como método preliminar en los rodeos que no están vacunados (Sandvik, 1999, 2005), asumiendo que los animales PI poseen títulos de anticuerpos bajos o negativos luego de la exposición o vacunación al vDVB (Fray et al., 2000). La serología permite además constatar infecciones agudas mediante ELISA que detecta anticuerpos específicos (IgM) contra el vDVB evidenciando la reciente exposición al virus (Saliki and Duvobi, 2004). El diagnóstico del aborto por el vDVB se confirma mediante el aislamiento del virus en los tejidos fetales y las lesiones histopatológicas fetales compatibles (Casaro et al., 1971); o bien por la presencia de malformaciones congénitas (Hewicker-Trautwein et al., 1994); dependiendo del período gestacional donde actuó el vDVB. Por otro lado, con la técnica de PCR (rT-PCR) (Hyndman et al., 1998) se ha detectado RNA del vDVB en los fluidos de fetos bovinos.

#### 1.7.2.2. *Herpes Virus Bovino-1*

El herpesvirus bovino 1 pertenece a la familia *Herpesvirinae* y produce una enfermedad infecciosa aguda, febril, muy transmisible (Di Santo et al., 1995). El HVB-1 es principalmente un agente patógeno de las vías respiratorias (Miller, 1991) de animales jóvenes. Pese a ello, puede producir mortalidad embrionaria, abortos, infertilidad temporaria; enfermedad respiratoria (rinotraqueítis), conjuntivitis y enfermedad genital (vulvovaginitis y balanopostitis pustular) (Miller, 1991). Estas formas de presentación dependen del subtipo actuante (Smith, 1997). En Argentina se ha estimado que la seroprevalencia del HVB-1 en el sudeste de la provincia de Buenos Aires es del 24,8% en los bovinos de 6 a 12 meses de edad y del 84,1% para los bovinos

mayores de 2 años (Odeón et al., 2001) lo que demuestra la elevada prevalencia y temprana exposición del virus en el ganado bovino

La infección con el HVB-1 es transmitida por contacto directo de las vías respiratorias superiores, conjuntiva o mucosa del tracto genital. La principal fuente de infección son los animales que eliminan el virus mediante las secreciones respiratorias o genitales y los fetos abortados (Smith, 1997). El virus replica inicialmente en las células epiteliales del sitio de entrada produciendo destrucción celular y dependiendo del subtipo de virus, la infección puede seguir distintos caminos (Engels and Ackermann, 1996). Los abortos por HBV-1 son secuela de la enfermedad respiratoria y es raro que se presente junto a la forma genital (Gibbs and Rweyemamu, 1977). Los abortos pueden ocurrir en cualquier período de la gestación; sin embargo, son más frecuentes en el último trimestre (Kendrick, 1973, Miller, 1991). El HVB-1 se disemina por vía sistémica (viremia), atraviesa la barrera placentaria y llega al feto produciendo daño letal y aborto (Kendrick, 1973). El HVB-1 puede permanecer en estado de latencia en las células nerviosas y bajo ciertas circunstancias (estres, uso de corticoides), la infección puede reactivarse (Babiuk et al., 1996, Pérez, 2005, Jones et al., 2006) siendo esto un riesgo permanente para otros animales.

El diagnóstico del aborto por HVB-1 se confirma por el aislamiento del antígeno viral a partir de los tejidos fetales o preferentemente, de la placenta (Barr and Anderson, 1993). Sin embargo, el aislamiento viral requiere de cultivos celulares, de un número suficiente de partículas virales replicándose (Takiuchi et al., 2005) y mucho tiempo para la obtención de los resultados (Moore et al., 2000). Las lesiones microscópicas no son patognomónicas y usualmente están enmascaradas por la autólisis fetal (Kirkbride, 1990; Kendrick, 1973). Pese a esto, la histopatología permite observar pequeñas áreas de necrosis acompañadas de respuesta inflamatoria en hígado, bazo, glándulas adrenales, pulmón y riñón (Smith, 1997). Adyacentes a éstas áreas, se pueden encontrar cuerpos de inclusión intranucleares correspondientes al virus (Smith, 1997). Si bien en la placenta es común la vasculitis necrotizante (Kennedy and Richards, 1964), en general, la respuesta inflamatoria en éste tejido es mínima (Molello et al., 1966).

El antígeno del HVB-1 se puede detectar en tejidos fetales congelados mediante IF y en tejidos formolados con la técnica de IHQ. El empleo de la IHQ mediante el uso de anticuerpos monoclonales para HVB-1 ha demostrado ser más sensible que el aislamiento viral y que la IF para el diagnóstico de la enfermedad (Miller and Van Der Maaten 1989; Smith et al., 1989). La serología materna no es de gran utilidad debido a

que no existe correlación entre los títulos de anticuerpos de HBV-1 encontrados en el momento del aborto (Waldner, 2005) aunque la serología pareada puede evidenciar al HVB-1 en los rodeos que no han tenido exposición previa o no han sido vacunados (Smith, 1997). Por último, la técnica de PCR se ha adoptado para determinar la infección del HVB-1 en fetos abortados (Takiuchi et al., 2005) siendo ésta técnica más específica y sensible que los métodos de diagnóstico descritos previamente (Vilcek et al., 1994, Moore et al., 2000).

### 1.7.3. Protozoos

#### 1.7.3.1. *Neospora caninum*

En la actualidad, la neosporosis está considerada como una de las principales causas de aborto en el ganado bovino en los países desarrollados (McAllister and Lathan, 2002, Dubey, 2003, Dubey et al., 2005). En Argentina, la enfermedad fue evidenciada inicialmente mediante serología (Venturini et al 1995) quienes identificaron vacas seropositivas con problemas reproductivos. Posteriormente, la enfermedad se evidenció en fetos bovinos abortados en forma espontánea donde se detectaron anticuerpos y lesiones histopatológicas compatibles (Campero et al., 1997<sup>a</sup>, Venturini et al., 1999) las cuales fueron confirmadas mediante IHQ (Campero et al., 1998). *N. caninum* es un protozoo intracelular obligado, perteneciente al phylum Apicomplexa y a la familia *Sarcocystidae* (Dubey and Lindsay, 1996; Dubey et al., 2002). Los estadios parasitarios reconocidos son: taquizoíto, quiste tisular y ooquiste (Dubey et al., 2002). Se han identificado como hospedadores definitivos al perro, coyote (Dubey et al., 1988<sup>a</sup>, McAllister et al., 1998, Gondim et al., 2004) y el dingo (King et al., 2010) quienes eliminan ooquistes con sus heces. Los ooquistes constituyen la fase infectante para los hospedadores intermediarios (Dubey, 1999, Paré et al., 1998). La transmisión de la infección puede ser horizontal mediante la ingestión de ooquistes esporulados (Wouda et al., 1999, Dijkstra et al., 2001) o vertical por transmisión transplacentaria de taquizoítos de las madres infectadas a los fetos siendo ésta la principal vía de contagio (80-90% de los casos) (Anderson et al., 1997, Dubey et al., 1992, Paré et al., 1996). Se cree que luego de la ingestión de los ooquistes, los esporozoítos liberados en la luz intestinal son capaces de atravesar la mucosa intestinal y acceder a los tejidos fetales por la vía linfática y hematogena (Dubey, 2003). En las células huésped infectadas, el parásito se multiplica pudiendo ocasionar daño celular con necrosis e inflamación (fase

aguda), o formar quistes titulares capaces de persistir durante toda la vida del animal (fase crónica) (Dubey and Lindsay, 1996). Los bradizoítos contenidos en los quistes tisulares presentes en el sistema nervioso central (SNC) pueden reactivarse durante la gestación debido a influencias hormonales originando una nueva parasitemia (Sawada et al., 2000, Buxton et al., 2002, Innes et al., 2002). Si la infección fetal se produce entre el tercer y el sexto mes de gestación, la consecuencia más probable es el aborto (Dubey et al., 1992, Barr et al., 1994, Williams et al., 2000, Macaldowie et al., 2004). En cambio, si la infección ocurre en el último tercio de la gestación, pueden nacer terneros clínicamente normales pero congénitamente infectados (Williams et al., 2000, Guy et al., 2001, Innes et al., 2001, Maley et al., 2003). Existen fuertes evidencias con respecto a la repetición de abortos en las vacas infectadas con *N. caninum* (Anderson et al., 1995, Kim et al., 2002) siendo mayor el riesgo de aborto en las vacas seropositivas que en las seronegativas (Paré et al., 1997, Thurmond and Hietala, 1997). Existen varias herramientas diagnósticas para detectar la infección en los fetos abortados por *N. caninum* (Pereira-Bueno et al., 2003). Una de las técnicas más utilizadas es la histopatología fetal (Schock et al., 2000) combinada con IHQ de los tejidos que presentan lesiones compatibles con las producidas por el protozoo (Lindsay and Dubey, 1989, Anderson et al., 1991, Barr et al., 1990, 1991; Campero et al., 1997<sup>a</sup>, Campero et al., 1998, Dubey et al., 2006, Pescador et al., 2007). La serología mediante la IFI permite detectar la presencia de anticuerpos en el suero materno y en fluidos de cavidades fetales (Barr et al., 1995, Gottstein et al., 1998, Söndgen et al., 2001, Moore et al., 2002) y técnicas moleculares como PCR que han permitido detectar el parásito en SNC de fetos bovinos abortados espontáneamente (Gottstein et al., 1998, Baszler et al., 1999, Ellis et al., 1999, Collantes-Fernández et al., 2005, 2006, Medina et al., 2006, Moore et al., 2008). El diagnóstico de la enfermedad en el rodeo se efectúa mediante test serológicos como ELISA, IFI y el test de aglutinación directa (Conrad et al., 1993b, Dubey et al., 1996, Wouda et al., 1998a, Dubey, 1999, Atkinson et al., 2000, Sager et al., 2001, Jenkins et al., 2002, Dubey and Schares, 2006)

#### 1.7.3.2. *Tritrichomonas foetus*

La trichomonosis bovina es una enfermedad de transmisión sexual caracterizada por infertilidad temporaria, piómetra, pérdidas embrionarias y fetales tempranas y raramente abortos entre los 4-6 meses de gestación (Clark, 1971, BonDurant, 1997). En varias regiones de Argentina se considera que esta enfermedad es endémica (Mardones

et al., 2008), sin embargo la incidencia es variable dependiendo de las zona (Campero y Cobo, 2006). El agente causal es un protozoo flagelado móvil denominado *T. foetus*, parásito obligado del tracto reproductor bovino (Levine, 1973; Felleisen et al., 1999, BonDurant, 2005). La transmisión sexual puede ocurrir mediante el servicio con un toro infectado (portador asintomático) o bien contagiarse al servir una vaca infectada (Campero et al., 1983, Clark et al., 1986). En el macho, *T. foetus* se localiza en el pene y prepucio, limitándose a la superficie de las mucosas y sus secreciones (BonDurant, 2005; Corbeil et al., 2003). Los toros de mayor edad son más susceptibles debido al incremento en el número y profundidad de las criptas prepuciales lo cual favorece las condiciones de vida del flagelado (Bon Durant, 1997, BonDurant, 2005). Luego de la infección, los toros adultos se convierten en portadores asintomáticos de por vida; mientras que los toros jóvenes de 2 años pueden tener una infección transitoria (Campero et al., 1983). Las hembras pueden desarrollar inmunidad efectiva pudiendo eliminar al protozoo desde el útero a las 8 a 12 semanas post infección (Anderson et al., 1996, Corbeil and BonDurant, 2001) aunque en algunos casos, la infección puede persistir por más de 20 semanas y en raras ocasiones durante la gestación y el posparto (Skirrow and BonDurant, 1990). Estudios histopatológicos (Rhyan et al., 1988) han demostrado que *T. foetus* produce placentitis, sugiriendo que este podría ser uno de los mecanismos que provocan el aborto. El diagnóstico de la enfermedad en un rodeo problema puede confirmarse por cultivo y así evidenciar la presencia de *T. foetus* en los exudados genitales del toro, la vaca o en el contenido de abomaso de los fetos abortados (Bartlett, 1949, Clark, 1971). El diagnóstico más práctico y seguro se realiza en el macho (Campero et al., 1983) aunque existen ciertas diferencias en los resultados obtenidos que dependen del método de recolección y de los medios de cultivo utilizados (Witherspoon and Walter, 1966; del Campo et al., 1971, Santos and Amaral, 1974, Tedesco et al., 1979, Rong Lun et al., 2000). El feto es un material difícil de hallar al producirse el aborto a corta edad gestacional pudiéndose encontrar lesiones histopatológicas en el pulmón, abomaso e intestinos (Rhyan, 1988, Campero y Cobo, 2006) junto a la presencia de los protozoos en éstos tejidos mediante la técnica de IHQ (Rhyan, 1995, Morrell et al., 2005). *T. foetus* se puede observar en forma directa bajo el microscopio óptico, sin embargo el cultivo previo de las muestras de esmegma prepucial o MCV aumenta considerablemente la eficiencia diagnóstica (Clark, 1971, Campero et al., 1983). También se puede observar la morfología de estos flagelados mediante coloraciones (Giemsa) y tinciones especiales (Tinción 15, Lab Biopur,

Rosario). En un trabajo realizado por Mukhufhi et al., (2003) obtuvieron una concordancia completa entre los resultados obtenidos con el cultivo y PCR sobre 193 muestras de esmegma prepucial. Pese a esto, la técnica de PCR ha permitido detectar resultados falsos positivos obtenidos mediante el cultivo (BonDurant et al., 2003, Grahn et al., 2005) de casos provenientes del esmegma prepucial de toros vírgenes contaminados con otros protozoos que complican el diagnóstico (BonDurant et al., 1999, Campero et al., 2003).

#### 1.7.3.3. *Toxoplasma gondii*

*T. gondii* es un parásito intracelular obligado el cual posee un ciclo de vida sexual que se realiza en el gato quién es el huésped definitivo y un ciclo de vida asexual que puede ocurrir en cualquier animal de sangre caliente (huéspedes intermediarios). La enfermedad solo se presenta en ciertas especies y se caracteriza por ser zoonótica (Esteban-Redondo and Innes, 1997; Pereira-Bueno et al., 2004). El bovino y ovino muestran diferentes susceptibilidades a la infección por *T. gondii*. La infección primaria de éste parásito en la oveja preñada provoca abortos y nacimiento de corderos débiles, mientras que *T. gondii* es considerado como un agente infeccioso infrecuente capaz de infectar a los fetos bovinos (Dubey, 1986). Pese a esto, Canada et al., (2002) lograron el aislamiento de dicho agente en fetos bovinos naturalmente infectados. En un estudio experimental (Dubey, 1983; 1986), se infectaron bovinos con ooquistes de *T. gondii* y se observó que el parásito era eliminado y siendo indetectable a las pocas semanas post-infección. Moré et al., (2008) diagnosticaron la infección por *T. gondii* en vacas adultas; sin embargo ninguno de los fetos fueron positivos con la técnica de nested-PCR. Estos hallazgos coincidieron con los reportados por Reitt et al., 2007 y Moore et al., 2008. Pero contrariamente a estos resultados, Gottstein et al., (1998) y Sager et al., (2001) detectaron fetos bovinos positivos a *T. gondii* con la técnica de PCR en muestras de SNC. Es decir, que en los bovinos, el rol epidemiológico de *T. gondii* es incierto; con lo cual serán necesarios futuros estudios sobre la implicancia de este protozoo en el aborto bovino.

#### 1.7.3.4. *Sarcocystis*

*Sarcocystis spp.* es un protozoo intracelular obligado que tiene dos ciclos de vida los cuales se cumplen en los hospedadores definitivos (carnívoros), el ciclo sexual, y en los hospedadores intermediarios (herbívoros u omnívoros), el ciclo asexual (Dubey

and Lindsay, 2006). Estos últimos se infectan al ingerir agua o alimentos contaminados con ooquistes que son eliminados por los huéspedes definitivos (Dubey, 1989). Cuando son ingeridos los ooquistes, se liberan los esporozoítos y se inicia la infección en el hospedador intermediario que culmina con el establecimiento de los quistes en el tejido muscular (Dubey, 1989). Los bovinos solo son infectados por especies específicas, siendo reconocidas *Sarcocystis cruzi*, *Sarcocystis hominis* y *Sarcocystis hirsuta* (Dubey and Lindsay, 2006). Ocasionalmente, *S. cruzi* puede producir abortos y enfermedad sistémica aguda seguida de muerte en los bovinos (Dubey, 1989). La transmisión vertical ha sido documentada en infecciones por *S. cruzi* en estudios experimentales (Lopes et al., 2005, Savini et al., 1996) y esporádicamente en infecciones naturales (Dubey and Bergeron, 1982, Hong et al., 1982). Sin embargo, este evento es infrecuente y existe escasa información al respecto; siendo la transmisión horizontal la vía de infección más común de éste parásito (Moré et al., 2009). El diagnóstico antemortem de la sarcocystosis puede realizarse mediante la biopsia del tejido muscular y posterior examen histológico (Tenter, 1997) el cual permite diferenciar si se trata de un proceso activo de la enfermedad o de un hallazgo accidental. Además se han desarrollado distintos test serológicos y técnicas de PCR para distinguir las especies de *Sarcocystis* en el animal vivo (Tenter, 1997).

#### 1.7.4. Hongos

Los abortos causados por infecciones fúngicas varían dependiendo del clima y del medio ambiente debido a que son organismos saprófitos ambientales. La mayoría de los abortos micóticos en bovinos se han asociado a infecciones por *Aspergillus fumigatus* (Walker, 2007). Otras infecciones menos frecuentes son ocasionadas por *Absidia spp*, *Mucor spp*, *Rhizopus spp*, *Candida spp* y otras especies de *Aspergillus spp* (Foley et al., 1987, Knudtson and Kirkbride, 1992, Fiorentino et al., 2005). Los abortos son esporádicos y usualmente se presentan en el último trimestre de la gestación, siendo el principal signo clínico la retención placentaria dado el severo daño placentario que ocasiona (Barr and Anderson, 1993). Los factores predisponentes a la infección fetal son desconocidos aunque el consumo masivo de alimento en mal estado o la inmunosupresión por coinfecciones como el vDVB, pueden incrementar su riesgo (Kirkbride, 1985, Kirkbride, 1991). La injuria en el tracto respiratorio o digestivo de la vaca puede además favorecer la entrada de los hongos y posteriormente la diseminación hacia el útero y el feto por vía hematogena (Hill, et al., 1971).

Para el diagnóstico es fundamental remitir la placenta, asiento de la lesión primaria (Corbellini et al., 2003). Las placentitis son severas y se caracterizan por la presencia de necrosis cotiledonaria acompañada de respuesta inflamatoria supurativa y trombosis. Las lesiones en el feto son variables, consistiendo en lesiones circulares focalizadas en piel y en menor frecuencia, bronconeumonía. El diagnóstico se basa en el aislamiento del hongo en cultivo puro de placenta, contenido de abomaso o pulmón y en la presencia de lesiones en piel e identificación directa de las hifas con tinciones especiales mediante raspado. Las hifas también pueden demostrarse en la placenta y el pulmón (Corbellini et al., 2003) y también mediante tinción del fluido abomasal.

#### 1.7.5. Causas infecciosas poco frecuentes de aborto bovino

##### 1.7.5.1. *Mycoplasmas* y *Ureaplasmas*

Estos microorganismos se incluyen dentro de la clase Mollicutes y se caracterizan por ser muy pequeños y carecer de pared celular (Bergey, 1984). *Mycoplasma bovis genitalium*, *Mycoplasma bovis* y *Ureaplasma diversum* son transportados en la vulva, vagina de las hembras bovinas y en el prepucio, semen y uretra distal de los toros (Yaeger and Holler, 2007). Se transmiten en el servicio natural o artificial (semen contaminado) y por contacto con el medioambiente contaminado. *M. bovis genitalium*, *M. Bovis* y *U. diversum* pueden producir vulvovaginitis pustular, metritis, salpingitis, infertilidad y abortos que son poco frecuentes en la hembra (Doig, 1981, Saed and Al-Aubadi, 1983, Miller et al., 1994, Sanderson and Chenoweth, 1999). En el macho se han reportado casos de balanopostitis, epididimitis y producción de semen de mala calidad (disminución de la motilidad espermática, fenómenos de aglutinación y adherencia espermática) que afecta el proceso de fertilización (Panangala et al., 1982, Sanderson and Chenoweth, 1999). En el caso de *U. diversum* los abortos se presentan en el último tercio de la gestación (Miller et al., 1994). No son comunes las lesiones macroscópicas en el feto, pero en la histopatología se puede observar alveolitis con necrosis del epitelio y neumonía.

Para el diagnóstico de estos agentes infecciosos se puede efectuar el cultivo a partir de distintas muestras (semen, MCV, feto) pero es bastante dificultoso el aislamiento y además se requieren medios especiales que son costosos (Cipolla, 2000). Con *U. diversum* se demostró mayor sensibilidad empleando la técnica de PCR que con el cultivo en muestras de lavajes vaginales (Vasconcellos Cardoso et al., 2000).

#### 1.7.5.2. *Chlamydias*

Las Chlamydias son bacterias intracelulares obligadas que infectan células epiteliales, macrófagos y monocitos (Longbottom and Coulter, 2003). Poseen un ciclo de vida en el que se distinguen dos formas: el cuerpo elemental (EB), que es la forma infectante de la bacteria y el cuerpo reticular (RB), los cuales se adaptan específicamente a los ambientes extracelular e intracelular, respectivamente (Wyrick and Richmond, 1989, Longbottom and Coulter, 2003). Existen varias especies de Chlamydias, que infectan a una gran variedad de huéspedes y provocan diversas enfermedades (Perez-Martinez and Storz, 1985). Los abortos por Chlamydia ocurren esporádicamente, sin embargo en algunos rodeos se han registrado tormentas de abortos (Nabeya et al., 1991) pudiendo afectar hasta un 20% de las vacas preñadas (Perez-Martinez and Storz, 1985). La mayoría de los abortos se presentan en el último trimestre de la gestación y es frecuente encontrar en los fetos edema subcutáneo y aumento de los fluidos pleural y peritoneal (ascitis) de color rojizo. El hígado fetal está aumentado de tamaño y con aspecto nodular. Este tejido se puede utilizar para demostrar la presencia de los EB mediante la tinción de Giemsa o Giménez. Otros métodos diagnósticos son la inmunofluorescencia indirecta y el aislamiento (Nabeya et al., 1991).

#### 1.7.5.3. *Aborto Bovino Epizoótico (EBA)*

El EBA o “foothill abortion” es una enfermedad regional y fue descrita como la causa más común de aborto en los rodeos de carne en los estados de California (Kennedy et al., 1960), Nevada (BonDurant and Anderson, 1997) y Oregon (Hall et al., 2002). La infección en el feto es transmitida por una garrapata argásica, denominada *Ornithodoros coriaceus* que infecta a vacas o vaquillonas expuestas en áreas endémicas por primera vez (Kimsey et al., 1983). Se ha logrado reproducir experimentalmente la enfermedad en el ganado preñado mediante la inyección de timo de fetos con el cuadro de EBA (Stott et al., 2002). Mediante el empleo de la tecnología molecular se identificó una bacteria del grupo delta *Proteobacterium* la cual ha sido implicada como la causante de ésta enfermedad (King, et al., 2005, Teglas et al., 2006). La infección en la primera mitad de la gestación causa una infección fetal crónica y los abortos ocurren en el último trimestre. El diagnóstico de la EBA en un feto abortado se basa en la observación de lesiones macroscópicas e histológicas características. Existe un agrandamiento generalizado de los nódulos linfáticos y del bazo, hepatomegalia y distensión abdominal por ascitis, el timo puede estar reducido en tamaño con

hemorragia y edema (Kennedy et al., 1960, 1983). Para prevenir la enfermedad es imprescindible evitar la exposición de las hembras a la garrapata durante los primeros 6 meses de la gestación y para ello, se recomienda trasladar a los animales durante éste período a lugares más fríos, debido a que las bajas temperaturas limitan la actividad de estos parásitos.

### **1.8. CAUSAS NO INFECCIOSAS DEL ABORTO BOVINO**

Probablemente las causas de aborto bovino de origen no infeccioso sean subdiagnosticadas, debido a que en la mayoría de los casos su identificación resulta difícil (Kirkbride et al., 1973, Norton and Campbell, 1990). Diversos factores pueden estar involucrados como:

- 1) Factores nutricionales: exceso de proteínas o nitrógeno, deficiencia de  $\beta$  caroteno, selenio, yodo. Se ha reportado que las vacas de segunda parición puede ser la categoría más afectada ya que deben cubrir el incremento en la demanda nutricional del crecimiento para volver a quedar preñadas (Sanz et al., 2004). Otros autores (Thurmond et al., 1990<sup>b</sup>, Lòpez-Gatius et al., 2002) no han encontrado asociación significativa entre la edad de la vaca y la presentación de abortos.
- 2) Factores tóxicos: plantas (*Pinus ponderosa*, *Pinus cubensis*, *Locoweeds*, *Lantana camara*, etc) y micotoxinas. Que pueden tener un efecto inmunosupresor y potenciar la presentación de abortos de origen infeccioso. (Casteel, 1997)
- 3) Factores químicos: pesticidas, oxalatos, nitritos, etc. Los nitritos pueden producir en la vaca un stress hipóxico y como consecuencia de ello aborto por hipoxemia fetal (Casteel, 1997).
- 4) Factores hormonales: estrógenos, progesterona, glucocorticoides.
- 5) Factores físicos: ruptura de la vesícula amniótica, anemia, torsión uterina o del cordón umbilical, fiebre, mellizos. La preñez con dos fetos fue reportada por Lòpez-Gatius et al (2002) quienes estimaron que el riesgo de aborto era mayor en estas vacas que en las que gestaban un solo feto.
- 6) Factores genéticos: aberraciones en los genes o cromosomas que pueden ser de carácter hereditario.
- 7) Factores alérgicos: luego de la inyección de vacunas o vitamínicos y minerales que puedan desencadenar cuadros de hipersensibilidad.

La presencia de factores ambientales, genéticos o la interacción de ambos pueden ser el origen de las malformaciones congénitas (Leipold, 1982, Rousseaux, 1994). Dentro de las causas ambientales se han reportado plantas tóxicas (*Cicuta*, *Conium maculatum*), virus (vDVB, Virus de Akabane) drogas y agentes físicos (radiación, hipertermia) (Leipold et al., 1992). En el caso de los factores de origen genético, la mayoría escapan a la capacidad de la rutina diagnóstica, excepto para los que ocurren al final de la gestación y presentan alguna anormalidad fenotípica, por ejemplo en la artrogriposis hereditaria del ganado Hereford debida a la presencia de un gen autosómico recesivo (Van Huffel and De Moor, 1987).

La escasa información existente en nuestro país sumado a la limitada eficiencia del diagnóstico etiológico del aborto bovino sugiere que mayores trabajos deben hacerse en esta área de investigación. El advenimiento de la biología molecular, con técnicas más accesibles a medida que se va popularizando su uso en los laboratorios de diagnóstico veterinario, sugiere que su incorporación aportará información de utilidad en el diagnóstico etiopatológico de la problemática de las pérdidas reproductivas en los bovinos. La información previamente enunciada en esta Introducción sirve como base para enunciar las hipótesis y objetivos del presente proyecto de investigación cuyo cumplimiento permitirá mejorar los procedimientos diagnósticos utilizados hasta el presente.

## **2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1. HIPOTESIS**

- El desarrollo y la aplicación de técnicas diagnósticas mejoradas permitirá aumentar la eficiencia del diagnóstico del aborto bovino.
- Las causas infecciosas siguen siendo las principales responsables de la etiología del aborto bovino.

### **2.2. OBJETIVOS GENERALES**

- Desarrollo y aplicación de técnicas para mejorar la capacidad de diagnóstico del aborto bovino por causas infecciosas.

### **2.3. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Utilizar la serología fetal como una herramienta para evidenciar exposición fetal a agentes infecciosos durante la gestación.
- Efectuar la búsqueda de lesiones histológicas en fetos bovinos abortados compatibles con agentes productores de enfermedades infecciosas.
- Emplear tejidos fetales para desarrollar técnicas diagnósticas complementarias para evidenciar agentes de difícil aislamiento.
- Utilizar la técnica de PCR a partir de muestras clínicas a los fines de aplicarla en el diagnóstico de las enfermedades de la reproducción.

### **3. MATERIALES Y METODOS**

#### **3.1. EXAMENES DE FETOS Y PLACENTAS**

##### *3.1.1. Antecedentes, necropsia, estudio macroscópico y obtención de muestras.*

Cuando la información estuvo disponible, se recopilaron los datos vinculados al tipo de explotación, manejo sanitario, parámetros productivos y reproductivos, ubicación del establecimiento y toda información de relevancia aportados por el veterinario actuante. Se obtuvieron muestras de 150 fetos bovinos, provenientes de casos espontáneos de abortos de establecimientos con rodeos para carne y leche que presentaban problemas reproductivos. Los fetos fueron recolectados durante los años 2004, 2005 y parte de 2006, aportados por veterinarios privados, laboratorios de diagnóstico veterinario privados y por el Servicio de Diagnóstico del INTA Balcarce. Los fetos se procesaron en el área de Patología Veterinaria y laboratorios del Grupo de Sanidad Animal (Virología, Bacteriología e Histopatología Veterinaria) del INTA Balcarce. Se realizó la necropsia de los fetos y/o placentas (cuando estuvieron disponibles) (Fig. 5), identificando lesiones mediante el análisis macroscópico de los órganos. La edad de los fetos se estimó en base al peso (expresado en kg) (Fig. 6) y a la longitud desde la base de la nuca hasta la base de la cola (Hubbert, 1973, Kirkbride, 1986) (Fig. 7) y se registró el grado de autólisis fetal en una escala subjetiva desde 1 (leve) a 3 (severa) (Roberts, 1986).

Se recolectaron muestras del SNC, hígado, pulmón, glándulas adrenales, timo, linfonódulos, músculo esquelético, músculo retroocular, lengua, bazo, riñones, corazón, intestino y abomaso, para el análisis histopatológico de rutina (Prophet al., 1995, Campero et al., 2003). Se obtuvieron además muestras de contenido de abomaso y pulmón para cultivos microbiológicos, cuando estuvieron disponibles. Se obtuvieron muestras de bazo, timo y linfonódulos para aislamiento viral.

Se recolectó en forma estéril, fluidos de las cavidades fetales (abdominal, torácica y/o pericárdica) que se mantuvieron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento por técnicas serológicas para HVB y vDVB (seroneutralización), Neosporosis (IFI), Brucelosis (BPA, FLP) y Leptospirosis (MAT).

En cada feto se tomaron además muestras para PCR de: SNC, bazo, pulmón, hígado, riñón y fluidos de cavidad y de abomaso; las cuales se mantuvieron congeladas a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su precesamiento.



**Fig. 5. Necropsia de un feto bovino de 6 meses**



**Fig 6. Pesada de un feto bovino de 9 meses**



**Fig 7. Medición de un feto bovino de 4 meses**

### **3.2. CULTIVOS MICROBIOLÓGICOS**

Los cultivos microbiológicos se realizaron de rutina en todos los fetos, para el aislamiento de organismos aerobios y microaerófilos. El material fetal disponible (pulmón, contenido de abomaso y placentomas) se sembró simultáneamente en placas de Agar Columbia (Oxoid Ltd, Wad Road, Basingstoke, Gran Bretaña) adicionado con 5 %

de sangre bovina desfibrinada estéril; Agar Skirrow con antibióticos (Terzolo et al, 1991) y en Agar Mc Conkey (Oxoid Ltd, Wad Road, Basingstoke, Gran Bretaña). Todas las placas fueron incubadas a 37 °C durante 48 hs en aerobiosis. A su vez, las placas de Agar Columbia se incubaron en atmósfera de 10 % CO<sub>2</sub> y se examinaron diariamente durante 7 días. Las placas de Agar Skirrow se incubaron en atmósfera microaerófila (90 % de H<sub>2</sub>, 5 % de O<sub>2</sub> y 10 % de CO<sub>2</sub>), para diagnóstico de *Campylobacter sp.* (Campero et al., 1994) y se examinaron cada 48hs durante 7 días. Por último, las placas de Agar Mc Conkey se incubaron en aerobiosis y fueron examinadas a las 24 hs. Los aislamientos bacterianos se identificaron mediante los procedimientos de rutina (Holt, 1994). Las muestras de fluido abomasal se sembraron en caldo infusión hígado para el cultivo de *T. foetus*, incubados a 37 °C durante 7 días con observaciones microscópicas diarias (Campero et al., 1986). No se intentaron hacer cultivos y aislamientos de Chlamydias, hongos y Mycoplasmatales.

Los aislamientos bacterianos se consideraron como bacterias oportunistas cuando los microorganismos aislados se obtuvieron en cultivos puros, produjeron lesiones patológicas en los tejidos fetales y eran agentes abortigénicos esporádicos en el bovino (Kirkbride, 1993, Yaeger and Holler, 2007).

### 3.2.1. Frotis de contenido abomasal

Cuando estuvieron disponibles, se efectuaron de rutina en los fetos frotis del contenido abomasal; los mismos se fijaron con metanol y se colorearon con fucsina fenicada, azul de metileno, Giemsa y Gridley (Luna, 1968) para observar formas bacterianas y micelios de hongos, respectivamente.

## 3.3. CULTIVOS VIRALES

La técnica se aplicó de rutina en todos los fetos disponibles. Se utilizaron secciones de bazo y linfonódulos para el cultivo viral las cuales fueron suspendidas al 10 % en el medio de Hank's y homogeneizadas utilizando un macerador, siendo luego clarificadas por centrifugación a 10000 rpm durante 5 min. Se inocularon alícuotas de 30 µl del sobrenadante por triplicado en células Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) y se incubaron a 37 °C en atmósfera con 5 % de CO<sub>2</sub> donde se realizaron 4 pasajes por cultivos celulares de 72 hs cada uno. Los cultivos celulares fueron monitoreados

diariamente para constatar el efecto citopático (ECP); en caso de no observarse dicho efecto en la monocapa preformada se confirmó por IFD. Para ello, las muestras de los cultivos fueron tripsinadas y resuspendidas en Minimum Essential Medium (MEM) (Gibco BRL, EE.UU) adicionado con 10 % suero fetal bovino (SFB) y antibióticos (100 ug/ml estreptomina y 100 u/ml penicilina). La suspensión celular fue transferida a portaobjetos para IF e incubadas en cámara a 37 °C. Luego los portaobjetos se fijaron en acetona por 20 min a -20 °C y se incubaron por 35 min a 37 °C en cámara húmeda con un antisuero policlonal conjugado con fluoresceína, siguiendo las instrucciones del fabricante (Direct FA Conjugate. American BioResearch, EE.UU). Las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS 1X, teñidas con Azul de Evans y lavadas nuevamente. Finalmente se examinaron bajo microscopia de epifluorescencia (Nikon Fluophot, 40 X 1,3).

### **3.4. HISTOPATOLOGIA**

En cada feto se recolectaron todos los órganos para análisis histopatológico los cuales fueron fijados en formol bufferado al 10 %, incluidos en parafina, seccionados, montados y teñidos con hematoxilina y eosina en forma rutinaria (Campero et al., 2003). Cuando fue necesario, se realizaron tinciones especiales a partir de los tejidos formolados como las Warthin Starry (para *Leptospira spp.*), Gridley y Grocott (para hongos) y Giemsa (para bacterias) (Luna, 1968).

Se evaluaron las lesiones histopatológicas observadas clasificando la severidad de las mismas en los diferentes órganos previamente mencionados. Se caracterizó la ubicación y el grado de lesión en el SNC de aquellos fetos donde se confirmó la presencia de *N. caninum* como agente causal del aborto. Para ello se siguió la propuesta de Moore et al., (2002) donde se dividió arbitrariamente el SNC en tres regiones (región 1: médula cervical, bulbo raquídeo, protuberancia y pedúnculos cerebrales; región 2: corteza frontal y occipital; región 3: cerebelo) estableciéndose cuatro grados de lesiones (0: ausencia de lesión, 1: lesión leve, 2: lesión moderada, 3: lesión severa), según su severidad, presencia y número de focos de gliosis, hemorragia, infiltrado inflamatorio, necrosis y meningitis no supurativa.

### **3.5. TECNICAS DE INMUNOHISTOQUIMICA**

### 3.5.1. *Neospora caninum*

Se realizaron cortes de aquellos fetos que presentaron lesiones histopatológicas compatibles con las producidas por *N. caninum* (encefalitis multifocal necrotizante, miocarditis y miositis no supurativas, glositis no supurativa) (Anderson et al., 2000). En todos los casos, los tejidos seleccionados fueron seccionados a 3-4  $\mu\text{m}$  de espesor y montados en portaobjetos especiales (Histoslides Probe-On; Fisher Scientific, Pittsburg, PA, EE.UU). Las muestras fueron desparafinadas en xilol, rehidratadas en etanol, y tratadas con metanol y peróxido de hidrógeno al 30 % (Sigma, St Louis, MO, EE.UU) durante 10 min para inhibir la actividad de la peroxidasa endógena (Campero et al., 1998, 2003). Las secciones fueron luego tratadas con pepsina (Sigma P7000, Sigma, St Louis, MO, EE.UU) (0,6 g en 150 ml de agua bidestilada y 1,5 ml de 1N ClH) durante 15 min a 37 °C en baño María. Para bloquear las uniones inespecíficas, los cortes fueron incubados a temperatura ambiente (TA) por 10 min con una solución de caseína al 0,5 % (Casein c-5890, Sigma, St Louis, MO, EE.UU).

Se utilizó la técnica de Avidin Biotina mediante un kit comercial (ABC Complex Vector Peroxidase Elite ABC PK6101, Vector Laboratories, Burlingame CA, EE.UU) (Campero et al., 1998, 2003). Las muestras fueron incubadas con el anticuerpo primario producido en conejo (anti-*Neospora* gentilmente cedido por el Dr. M. Anderson, CVDLS, UC Davis, Ca, EE.UU) diluido 1:300 e incubado durante 45 min a 37 °C en cámara húmeda. Los anticuerpos no unidos se removieron mediante 3 lavajes con PBS y luego se agregó el anticuerpo secundario biotilado anti-conejo mediante incubación durante 20 min a 37 °C en cámara húmeda. Posteriormente, los cortes se lavaron con PBS y se reincubaron con el anticuerpo terciario (ABC) durante 20 min a 37 °C en cámara húmeda. Luego las secciones se lavaron 3 veces con PBS y fueron expuestas a un agente cromógeno a base de aminoetilcarbazol: (Dako AEC Substrate-Chromogen System Code N1 K 3464, Carpintería, CA, EE.UU). Finalmente se tiñeron con hematoxilina de Mayer (Mayer's Hematoxylin solution, Sigma Diagnostics, MO, EE.UU) y se montaron con Crystal Mount (Biomedex, Foster City, CA, EE.UU) para su observación al microscopio óptico. En todos los casos se utilizaron controles positivos y negativos apropiados.

### 3.5.2. *Leptospira* spp.

A los fines de adecuar el protocolo a utilizar, se realizó un trabajo previo donde se emplearon secciones de tejidos de 25 fetos y un neonato de 3 días de vida con

diagnóstico positivo previo de leptospirosis por IFD y/o con lesiones histológicas compatibles con las provocadas por dicho agente. En base a la eficacia y a los problemas que se presentaron, se realizaron distintos protocolos con varias modificaciones (Tabla 1). En cada caso se utilizaron cortes de tejidos fetales (hígado, pulmón y/o riñón) fijados en formol bufferado al 10 %, los cuales fueron incluidos en parafina, seccionados y montados en portaobjetos especiales cargados negativamente (Probe-On; Fisher Scientific, Pittsburg, PA, EE.UU). Para los protocolos N° 1 y N° 5 (Tabla 1), los cortes se procesaron siguiendo las indicaciones exactas de los kits comerciales de estreptavidina biotina (Dako Cytomation LSAB + System K0679, CA, EE.UU) y de avidina biotina (Vector Peroxidase Elite ABC PK6101, Vector Laboratories, Burlingame CA, EE.UU), respectivamente. Los restantes protocolos sufrieron modificaciones menores las cuales se basaron en el empleo de distintas diluciones, tiempos de incubación y temperatura del anticuerpo primario; en la presencia o ausencia de bloqueo y en el método de recuperación antigénica (Tabla 1).

Técnica	Dilución anticuerpo primario	Recuperación antigénica	Bloqueo	Tiempo e incubación anticuerpo primario	
1- LSAB	1/200- 1/500-1/700	no	no	30'	TA
2- LSAB	1/700- 1/900	pepsina	no	30'	TA
3- LSAB	1/500-1/700-1/900	pepsina	no	18 hs	4° C
4- ABC	1/900	pepsina	si	18 hs	4° C
5- ABC	1/800	pepsina	si	45'	TA
6- ABC	1/800	proteasa	si	18 hs	4° C
7- ABC	1/500- 1/800	calor	si	45'	TA
8- ABC	1/1000	calor	si	45'	TA

**Tabla 1: diferentes protocolos utilizados al evaluar IHQ para *Leptospira sp***

Referencias: ABC: Avidina Biotina, LSAB: Estreptavidina Biotina, TA: temperatura ambiente

### 3.5.3. IHQ de otros agentes infecciosos

La IHQ se empleó además como técnica auxiliar confirmatoria en los casos de aborto con diagnóstico previo por aislamiento a *B.abortus*, *C. fetus*, *T. fetus* y *L. monocytogenes*. Con los 3 primeros agentes se utilizaron cortes de tejido pulmonar e intestino, mientras que para el caso de *L. monocytogenes* se empleó SNC e hígado. Los tejidos se procesaron en base al protocolo previamente descrito para *N. caninum* (3.5.1) siguiendo trabajos previos realizados por nuestro grupo de trabajo (Campero et al., 2002, Cobo et al., 2004, Campero et al., 2005, Morrell et al., 2005). Los anticuerpos primarios utilizados fueron en todos los caso policlonales y las diluciones empleadas

variaron según el agente infeccioso involucrado: *Listeria monocytogenes* 1:1500 (Difco Listeria 0 Antiserum Poly Serotypes 1,4. Becton, Dickinson and Company, EE.UU); *Brucella abortus* 1:200 (Brucella Positive Control Antiserum, Becton, Dickinson and Company, EE.UU); *Campylobacter fetus* 1:500 (Laboratorio de Azul, Azul, Argentina) y *Tritrichomonas foetus* 1:500 (elaborado por el Dr Campero, INTA EEA Balcarce).

### **3.6. LECTINOHISTOQUIMICA**

Esta técnica fue utilizada únicamente en secciones de 8 fetos bovinos expresamente seleccionados por presentar diagnóstico positivo mediante cultivo de *C. fetus*. Se emplearon muestras de pulmón e intestino fijadas en formol bufferado al 10 %, incluídos en parafina, seccionados a 5  $\mu\text{m}$  y montados en portaobjetos. Los cortes se incubaron con peróxido de hidrógeno al 0,3 % en metanol (para inhibir la actividad de la peroxidasa endógena) a temperatura ambiente durante 30 min. Se lavaron varias veces con PBS 0,01M (pH 7,2) y se trataron con albúmina bovina al 0,1 % en PBS durante 15 min. Posteriormente se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con las lectinas biotiniladas (Leathem, 1986). Para ello se utilizaron 7 lectinas (Lectin Kit BK 1000; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU), con distintas especificidades, a saber: Con A (*Concanavalia ensiformis*, binding specificity  $\alpha$ -D-Man and  $\alpha$ -D-Glc); DBA (*Dolichos biflorus*, binding specificity  $\alpha$ -D-GalNAc); SBA (*Glycine max*, binding specificity  $\alpha$ -D-GalNAc,  $\alpha$ -D-GalNAc and  $\alpha$  and  $\beta$ -Gal); PNA (*Arachis hypogaea*, binding specificity  $\beta$ -D-Gal and (1-3) Gal Nac); RCA -I (*Ricinus communis-I*, binding specificity  $\beta$ -D-Gal and  $\alpha$ -D-Gal); UEA-1 (*Ulex europaeus-I*, binding specificity  $\alpha$ -L-Fuc); y WGA (*Triticum vulgare*, binding specificity  $\alpha$ -D-GlcNAc and NeuNAc). La concentración óptima utilizada para todas las lectinas fue de 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en PBS, a excepción de la lectina PNA que se utilizó en una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Luego se incubaron las secciones con el complejo avidin biotin peroxidasa (ABC PK6101, Vector Laboratories, Burlingame CA, EE.UU) durante 45 min y posteriormente incubadas durante 4 a 10 min con la enzima peroxidasa, la cual fue activada con una solución de peróxido de hidrógeno al 0,05 % y expuesta con el agente cromógeno diaminobenzidina al 0,02 %. Finalmente los cortes se lavaron con agua destilada, se deshidrataron con etanol a distintas concentraciones, se clarificaron con xilol y fueron montadas en portaobjetos Permount (Fisher Scientific Internacional, Hampton, NH, EE.UU). Para el

control de la técnica se omitieron las lectinas o fueron bloqueadas mediante la incubación de las lectinas con el azúcar apropiado (en una concentración de 0,1 a 0,2M en PBS) durante una hora a temperatura ambiente antes de ser incubadas con las muestras. Con cada lectina se utilizaron controles positivos (fetos abortados por *C. fetus*) y controles negativos (fetos con diagnóstico indeterminado).

Para cada tejido estudiado (pulmón o intestino), se observó el grado de unión de las lectinas hacia las distintas estructuras: pulmón (bronquios, bronquiólos, alvéolos y endotelio capilar) y en intestino (enterocitos y células globosas de las criptas y de las vellosidades). La intensidad de unión de las lectinas a los tejidos fue evaluada subjetivamente en una escala desde 0 (negativo) a 3 (positivo intenso) (Cobo et al., 2004).

### **3.7. TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA (IF)**

#### **3.7.1. IF indirecta para *Neospora caninum***

La prueba de IFI se realizó a partir de fluidos de las cavidades fetales considerándose como criterio de positividad los títulos  $\geq 1:25$  (Wouda, Dubey and Jenkins, 1997; Moore et al., 2002). Como antígeno de *N. caninum* se utilizó la cepa de referencia Nc-1 (gentilmente cedida por la Dra. Venturini, FCV, UNLP) a una concentración de  $10^7$  protozoos por ml de solución salina tampón estéril (SSTE). Se depositó una gota de ésta suspensión de taquizoítos en cada hoyuelo de los portaobjetos específicos (ICN, catálogo N° 6041505, EE.UU) y se dejó secar a TA. Los fluidos fetales problema fueron diluidos con SSTE (pH 7,2) suplementada con 1 % de albúmina sérica bovina (ASB) (Sigma, A3059, St. Louis, EE.UU) e incubados con el antígeno en cámara húmeda durante 40 min a 37 °C. Los portaobjetos se lavaron en SSTE durante 10 min en agitación constante y luego se les agregó una anti IgG1-IgG2 bovina producida en conejo y marcada con fluoresceína (Sigma, F-7687, St. Louis, EE.UU), incubándose durante 40 minutos a 37 °C en cámara húmeda. Por último, los portaobjetos fueron lavados con SSTE, pH 9,0 montados con glicerol bufferado y examinados en un microscopio de epifluorescencia (Nikon Fluophot) a 40X considerándose como positivo aquellas diluciones donde los taquizoítos presentaban fluorescencia completa. En todos los casos se utilizaron sueros controles positivos y negativos disponibles en el banco de sueros del laboratorio del Dr. Campero, INTA Balcarce.

### 3.7.2. IF directa para *Leptospira spp.*

Se utilizó como técnica de rutina en los fetos el análisis de las improntas de hígado, pulmón, riñón fetal y muestras de humor acuoso. Las improntas se fijaron en acetona a 4 °C durante 15 min; se dejaron secar a TA y se mantuvieron refrigeradas hasta su procesamiento, como máximo dentro de los 7 días de su recolección. Las improntas se lavaron en PBS pH 7,2 durante 10 min, se dejaron secar a TA y luego se les agregó un antisuero policlonal en conejo (Lepto Multivalent antiserum NVLS, EE.UU) marcado con fluoresceína en una dilución de 1:5 (Morrell et al., 2006). Posteriormente, las muestras se colocaron en cámara oscura húmeda y se incubaron a 37 °C durante 45 min. Se lavaron las improntas en PBS pH 7,2 durante 10 min en agitación constante y se dejaron secar. Luego se les aplicó un cubreobjeto montado con una gota de solución de glicerina bufferada pH 9,0. Finalmente, las muestras se observaron con microscopio de epifluorescencia (Nikon Fluophot, 40 X 1,3). En todos los casos se utilizaron controles positivos (improntas de riñón de hamsters previamente inoculados con *L. pomona* y controles negativos (Morrell et al., 2006).

### 3.7.3. IF directa para *Campylobacter fetus*

Se utilizó el conjugado elaborado por el Laboratorio Azul (Azul, prov Bs As) en una dilución de 1/60 la cual fue previamente elegida en base a diferentes diluciones, siendo ésta la que permitió la correcta visualización y discriminación de la morfología de *Campylobacter*. Para realizar la técnica de IFD a partir de fluido de abomaso, cada muestra fue sometida a una primera centrifugación durante 15 minutos a 500 G en la que se descartó el sedimento y se conservó el sobrenadante. Luego se realizó una segunda centrifugación para aumentar la concentración de *C. fetus* durante 30 minutos a 5.000 G, se descartó el sobrenadante y se procesó el sedimento (Philpott 1960, Mellick 1964, Dufty 1960). Para preparar los extendidos se utilizaron portaobjetos para IF con pocillos en los cuales se depositó cuidadosamente una gota del sedimento homogeneizado de la muestra. Se colocaron además en cada portaobjeto los controles de antígeno positivo (*C. fetus*) y negativo (*C. sputorum biovar. bubulus*). Los extendidos se secaron a temperatura ambiente y se fijaron por inmersión en alcohol etílico durante 10-15 minutos, se dejaron secar nuevamente y se lavaron con PBS pH 7,2 (Mellick 1964). Luego a cada pocillo se le agregó el conjugado, incubándose luego en cámara oscura y húmeda a 37 °C durante 30 minutos (Mellick 1964, Dufty 1967). Finalmente se lavaron

los portaobjetos en PBS en agitación constante durante 10 minutos y se dejaron secar al resguardo de la luz. La observación se realizó con microscopio óptico con sistema de epifluorescencia con objetivo 40X confirmando el diagnóstico con objetivo 100X (NIKON Microflex HFM, Japón).

### **3.8. PRUEBA DE SERONEUTRALIZACION VIRAL**

Dicha técnica se realizó a partir de muestras de fluidos fetales para detectar la presencia de anticuerpos circulantes contra el vDVB y el HVB. Se utilizó la técnica de microtitulación (Van der Maaten et al., 1985) empleando placas de 96 hoyuelos en células MDBK. Luego de la inactivación de las muestras por calor durante 30 min a 56° C, se realizaron diluciones seriadas en base 2 de cada una y se les agregó un inóculo viral conteniendo 100 DICC<sub>50</sub>/50μl (100 dosis infecciosas medias en cultivo de células por 50μl). Posteriormente, se incubó por 1 hora a 37 °C, se le adicionó una suspensión de células MDBK a razón de 50μl/hoyuelo. En cada test se incluyó un control de DICC<sub>50</sub>/ml (dosis infecciosa media en cultivo de células por mililitro) y controles positivos y negativos. El título de anticuerpos fue determinado como la dilución más alta que presentó inhibición completa del efecto citopático después de 72 hs de incubación. Los títulos  $\geq 1:8$  fueron considerados positivos para la presencia de anticuerpos en fluidos fetales (Moore et al., 2003, Odeón et al., 2003).

### **3.9. TECNICA DE PCR**

El criterio utilizado para realizar PCR se basó en el empleo de tejidos fetales que presentaban lesiones histopatológicas sugestivas de ser provocadas por un posible agente infeccioso, aunque sin diagnóstico etiológico establecido en base a las pruebas previamente mencionadas. El tipo de muestras utilizadas fueron seleccionadas específicamente para cada agente infeccioso. Las mismas fueron mantenidas a -70 °C hasta su procesamiento y en algunos casos, se procesaron además muestras formoladas y en parafina.

Para la extracción del ADN se utilizó un kit comercial (Dneasy Tissue Kit Qiagen, QIAGEN Group, USA). El procedimiento del kit requirió de varias etapas, comenzando en un principio con la lisis de la muestra mediante el empleo de proteinasa K. Luego de este paso, el lisado se colocó en una columna pequeña de plástico conteniendo una membrana en su interior. Se realizaron varias centrifugaciones y

lavados con distintos buffers específicos que permitieron que el ADN quedara retenido a la membrana, mientras se removieron (atravesaron la membrana) los contaminantes de las muestras. Finalmente se realizó una elución final con agua ultrapura con la que se obtuvo el ADN total de la muestra.

Además, se implementaron diferentes protocolos de trabajo debido a la escasa información sobre la técnica de PCR aplicada al diagnóstico de agentes infecciosos presentes en los tejidos fetales autólitos de casos naturales de abortos. Finalmente, los productos de PCR fueron revelados por electroforesis en un gel de agarosa al 2 % y teñidos con bromuro de etidio. Los controles positivos (ADN de los cultivos en pureza de los microorganismos causales de infección conocida) y negativos (agua bidestilada) fueron incluidos en todas las reacciones.

### **3.10. CAUSAS DETERMINADAS INFECCIOSAS**

Son las causas de origen infeccioso (bacterias, virus, protozoos) que se determinaron mediante las técnicas convencionales diagnósticas de laboratorio.

#### **3.10.1. Bacterias**

##### **3.10.1.1. *Brucella abortus***

El diagnóstico de *B. abortus* se determinó mediante el cultivo microbiológico (3.2) y análisis histopatológicos (3.4) e inmunohistoquímicos (3.5.3). Además se aplicó la técnica de PCR que se detalla a continuación.

5.1.2.1. PCR para *B. abortus*. Para adecuar la técnica, se emplearon controles positivos y muestras de pulmón y de contenido abomasal de los fetos con aislamiento positivo a *B. abortus*. Posteriormente se procesaron las muestras (pulmón y contenido abomasal) de los fetos con diagnóstico indeterminado. El control positivo se obtuvo de un cultivo puro de *B. abortus* y del contenido abomasal de un feto con aislamiento de *B. abortus*, como control negativo se utilizó agua bidestilada. Se utilizaron diferentes métodos de extracción: tratamiento con isopropanol (Apéndice 1 y Apéndice 2), empleo de un kit comercial (Qiagen) y tratamiento con fenol-cloroformo-isoamílico (Apéndice 4).

En base a trabajos de referencia (Bricker and Halling, 1994,1995) se utilizaron los primer IS 711 (forward) 5'TGCCGATCACTTAAGGGCCTTCAT<sub>3</sub>' y All bru (reverse) 5'GACGAACGGAATTTTTCCAATCCC<sub>3</sub>' que amplificaron un fragmento de ADN de 498 bp. Para preparar la mezcla se compararon distintos trabajos de referencia

(Fekete et al., 1992, Galleen et al., 1998, Cetinkaya et al., 1999, Cortez et al., 2001), finalmente se utilizó un protocolo gentilmente cedido por la Dra Echaide, (INTA Rafaela) en el cual se empleó un volumen final de 50 µl compuesto por: Buffer 10X (500 mM KCl, 100mM Tris-HCl) (Promega), 0,2 mM de la mezcla de dNTP'S (Promega), 0,8 µM de cada primer (Invitrogen), 3 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega), 2,5 UI de la enzima Taq DNA polimerasa (Promega), 10 µl de ADN y agua bidestilada hasta completar el volumen de la mezcla. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Gene Amp 2400; Perkin-Elmer) con un programa de 40 ciclos compuesto por desnaturalización inicial (94 °C durante 4 min), desnaturalización (94 °C durante 40 seg), annealing (58 °C durante 40 seg) extensión (72 °C durante 40 seg) y extensión final (72 °C durante 4 min). Los productos de la amplificación fueron separados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2 % preparado con bromuro de etidio y visualizados mediante luz ultravioleta en un transiluminador (UV Transilluminator, UVP).

#### 3.10.1.2. *Campylobacter fetus*

El diagnóstico de *C. fetus* se realizó mediante el cultivo microbiológico (3.2), análisis histopatológicos (3.4), inmunohistoquímicos (3.5.3) y lectinohistoquímicos (3.6). Además se aplicaron las técnicas de IFD (3.7.3) y PCR. Para adecuar la técnica de PCR, se emplearon controles positivos y muestras de pulmón y de contenido abomasal de los fetos con aislamiento e IFD positiva a *C. fetus*. Luego de este paso, se procesaron el resto de las muestras (pulmón y contenido abomasal) provenientes de los fetos con diagnóstico indeterminado. Se utilizaron como controles positivos cepas de referencia (Laboratorio de Bacteriología, INTA Balcarce) provenientes de fetos bovinos abortados (*C. fetus* spp. *venerealis* 395 INTA y *C. fetus* spp *fetus* 02/211), MCV de vaca abortada (*C. fetus* spp. *venerealis* SA 46 y *C. fetus* spp. *fetus* C1N2) y como control negativo, se utilizó una cepa de *C. sputorum* spp. *bubulus* (no patógeno) y agua bidestilada. Dada la carencia de información disponible al tener que trabajar con tejidos fetales concierto grado de autólisis, se debieron probar diferentes protocolos de trabajo. Para ello, la extracción del ADN se realizó con isopropanol (Apéndice 1 y Apéndice 2) y con el kit Qiagen.

Los primers empleados fueron seleccionados según Hum et al., (1997): MG3F (forward primer) GGTAGCCGCAGCTGCTAAGAT y MG4R (reverse primer)

TAGCTACAATAACGACAACCT específicos para *C. fetus* (764 bp) y par de primers Ven SF (forward primer) CTTAGCAGTTTGCGATATTGCCATT y Ven SR (reverse primer) GCTTTTGAGATAACAATAAGAGCTT específicos para *C. fetus venerealis* (142 bp). Para la amplificación del ADN se probaron varios protocolos de referencia (Hum et al., 1997; Schulze et al., 2006). Finalmente se utilizó el descrito por Schulze et al (2006) con algunas modificaciones. La mezcla se preparó con un volumen final de 50 µl conteniendo 10 µl 5x Green Go Taq Reaction Buffer (Promega), 2 µl de la mezcla de deoxynucleótidos trifosfato (dNTPs) (Promega) 0,2 mM, 0,2 µl Taq DNA polimerasa (Promega), 1 µl de MG3F (forward primer) y 1 µl MG4R (reverse primer) 10 µM, 30,8 µl de agua bidestilada y una alícuota de 5 µl de ADN.

La amplificación se realizó en un termociclador (Gene Amp 2400; Perkin-Elmer) utilizando un programa específico con una desnaturalización inicial de 96 °C durante 1 min, seguida de 35 ciclos compuestos por desnaturalización (96 °C durante 15 seg), annealing (55 °C durante 1 min) y extensión (72 °C durante 1,30 min) (Morrell, datos sin publicar). El programa de amplificación finalizó con una extensión final de 72 °C durante 3 min. El producto amplificado se sembró en un gel de agarosa al 2 % preparado con una solución de TBE al 1 % y bromuro de etidio (10mg/ml). El gel se colocó en una cuba de electroforesis conteniendo TBE al 1 %. Luego las muestras se sometieron a electroforesis a 100 volts y finalmente se visualizaron bajo luz ultravioleta. Se empleó un marcador de peso molecular de 100-bp estándar (Biodynamics) para comparar los resultados obtenidos.

### 3.10.1.3. *Leptospira spp.*

Para el diagnóstico de *Leptospira spp* se realizaron análisis histopatológicos y la tinción especial de Warthin Starry (3.4), análisis inmunohistoquímicos (3.5.2), y se aplicó la técnica de IFD (3.7.2) y PCR para *Leptospira spp*. Para ello, el primer paso fue adecuar la técnica, para lo cual se utilizaron controles positivos como: 1) un cultivo puro de *L. pomona* en medio EMJH 2) tejidos de hamsters (bazo, hígado y riñón) inoculados experimentalmente con *L. pomona* (gentileza Laboratorio Azul, Azul, Argentina) y 3) órganos (congelados, en parafina y en formol) y fluidos (humor acuoso, contenido de abomaso) de fetos con diagnóstico positivo por IFD a *Leptospira spp*. Como control negativo se empleó agua bidestilada. El ADN se extrajo con el kit Qiagen. También se realizó la extracción de ADN en los tejidos con el método de fenol-cloroformo-isoamílico (Apéndice 4). Se utilizaron protocolos de extracción específicos

para las muestras en parafina (Apéndice 5 y con Qiagen) y las muestras en formol (Apéndice 6). Finalmente para las muestras de contenido de abomaso y humor acuoso se aplicó un método de extracción con Resina (Apéndice 7) (gentilmente cedido por la Dra. Vanasco, Instituto Coni, Santa Fe). Los primers Lep1 (forward): 5'GGCGGCGCGTCTTAAACATG<sup>3'</sup> y Lep2 (reverse): 5'TTAGAACGAAGTTACCCCCCTT<sup>3'</sup> y las condiciones de amplificación se realizaron en base a un trabajo de referencia (Mérien et al., 1992) y a un protocolo gentilmente cedido por la Dra Vanasco (Instituto Coni, Santa Fe). Los primers Lep1 (forward): 5'GGCGGCGCGTCTTAAACATG<sup>3'</sup> y Lep2 (reverse): 5'TTAGAACGAAGTTACCCCCCTT<sup>3'</sup> amplificaron un segmento de 289 pb.

Para la mezcla el volumen final fue de 25 µl compuesto por: Buffer 1X (50mM ClK y 10 mM Tris pH 8,4), 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de la mezcla de dNTP'S (Promega), 1 µM de cada primer (Lep 1 y Lep 2), 1U/25µl de la enzima Taq DNA polimerasa (Promega), 5 µl de ADN y agua bidestilada hasta completar el volumen final. El programa de amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Gene Amp 2400; Perkin-Elmer) compuesto por un 1º paso de un ciclo (94 °C durante 3 min, 63 °C durante 1.5 min y 72 °C durante 2 min), 2º paso de 40 ciclos (94 °C durante 3 min, 63 °C durante 1.5 min y 72 °C durante 2 min) y un 3º paso de un ciclo (72 °C durante 10 min). Por último, los productos de la amplificación obtenidos fueron sembrados en un gel de agarosa al 2 % preparado con bromuro de etidio, separados mediante electroforesis a 100 volts y visualizados mediante luz ultravioleta en un transiluminador (UV Transilluminator, UVP).

#### *PCR multiplex para B. abortus y Leptospira spp.*

Las muestras y los controles (positivos y negativos) utilizados para PCR multiplex fueron los mismos que para el PCR de *B. abortus* y *Leptospira spp.* previamente mencionados, en cada caso, respectivamente.

Para la extracción del ADN de ambos agentes infecciosos, se utilizaron distintos protocolos (Apéndice 8 y 9) en base a un trabajo de referencia (Richtzenhain et al., 2002) y además se empleó el kit comercial Qiagen.

La amplificación se realizó en base al trabajo de Richtzenhain et al., 2002 con los primers: BF (forward): 5'TGGCTCGGTTGCCAATATCAA<sup>3'</sup> y Bru5 (reverse): 5'GTCTGGAACCTTCCGTTTCGCGC<sup>3'</sup> de *Brucella abortus* (223 pb) y los primers

Lep1F (forward): 5'GGCGGCGCGTCTTAAACATG<sup>3'</sup> y Lep2 (reverse) 5'TTCCCCCATTGAGCAAGATT<sup>3'</sup> de *Leptospira sp* (331 pb).

El volumen final de la mezcla fue de 50 µl conteniendo: Buffer 10X (Promega), 0,2 mM de la mezcla de dNTP'S (Promega), 10 µM de cada primer (B4, B5, Lep 1 y Lep 2), 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 U/ml de la enzima Taq DNA polimerasa (Promega), 10 µl de ADN y agua bidestilada hasta completar el volumen final. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Gene Amp 2400; Perkin-Elmer) con un programa de 35 ciclos compuesto por una desnaturalización inicial (94 °C durante 3 min), desnaturalización (94 °C durante 60 seg), annealing (60 °C durante 60 seg) extensión (72 °C durante 90 seg) y extensión final (72 °C durante 10 min). Finalmente los productos de la amplificación fueron separados mediante electroforesis a 100 volts en un gel de agarosa al 2 % preparado con bromuro de etidio y luego fueron visualizados mediante luz ultravioleta en un transiluminador (UV Transilluminator, UVP).

#### 3.10.1.4. *Bacterias oportunistas*

Para confirmar el diagnóstico de las bacterias oportunistas como agentes causales de aborto, las mismas se aislaron en cultivos microbiológicos (3.2) y además se observaron lesiones histopatológicas (3.4).

### 3.10.2. Virus

#### 3.10.2.1. *Diarrea Viral Bovina*

Para su diagnóstico se realizó el cultivo virológico (3.3), análisis histopatológicos (3.4), la prueba de seroneutralización viral (3.8) y la técnica de rt-PCR. Para esta última (Ridpath et al., 1994) se procesaron muestras de bazo y fluidos de cavidad de los fetos con diagnóstico indeterminado, las cuales fueron conservadas a -70 °C hasta su procesamiento. Los controles positivos fueron las cepas de referencia NADL y vDVB-Ncp 6138 y muestras de bazo y fluido de cavidad de dos fetos con aislamiento positivo al vDVB. Como control negativo se empleó agua bidestilada. Para obtener el ARN se optó por utilizar un kit comercial tanto para el bazo (QIAamp Viral RNA, QIAGEN, USA) como para los fluidos de cavidades (RNeasy Mini kit, QIAGEN Group, USA). Se utilizaron los primers HCV-368 (forward) 5'CCATGTGCCATGTACAG<sup>3'</sup> y HCV-90 (reverse) 5'CATGCCCATAGTAGGAC<sup>3'</sup> que amplificaron un fragmento de ARN de 283 pb. Para la mezcla se empleó un

volumen final de 50 µl compuesto por: 5 µl de Buffer 10X (500 mM KCl, 100mM Tris-HCl) (Promega), 0,75 µl de la mezcla de dNTP'S (Promega) 25 mM, 0,5 µl de cada primer (Invitrogen) 100 pm/ml, 3,2 µl de MgCl<sub>2</sub> (Promega) 25 mM, 1 µl de DTT 0,1M, 0,5 µl de RNAsin (Promega) 40 U/µl, 0,5 µl de la enzima transcriptasa reversa M-MLVRT (Promega) 200 U/µl, 0,5 µl de la enzima Taq DNA polimerasa (Promega) 5 U/µl, 2,5 µl de ARN y 35,05 µl de agua destilada para completar el volumen final de la mezcla.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Gene Amp 2400; Perkin-Elmer) con un programa compuesto por 3 etapas: a) 42 °C durante 60 min, 94 °C durante 2 min; b) desnaturalización (94 °C durante 1 min), annealing (48 °C durante 1 min); c) extensión (72 °C durante 30 seg) y extensión final (72 °C durante 1 min). Los productos de la amplificación fueron separados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2 % preparado con bromuro de etidio y visualizados mediante luz ultravioleta en un transiluminador (UV Transilluminator, UVP).

### 3.10.2.2. *Herpes Virus Bovino-1*

Para este diagnostico se realizó el cultivo virológico (3.3), la prueba de seroneutralización viral (3.8) y la técnica de PCR (Takiuchi et al., 2005, Alegre et al., 2001, Gogev et al., 2004) con mínimas modificaciones. Para ello se seleccionaron muestras de bazo de los fetos con diagnóstico indeterminado las cuales fueron conservadas a -70 °C hasta su procesamiento. El ADN de estas muestras se obtuvo con el kit comercial Qiagen. Como control positivo se utilizó la cepa de referencia Van Cooper y como control negativo agua bidestilada. Se emplearon los primers gDF (forward) 5' AACATGCAAGGGCCGACATTGG<sup>3'</sup> y gGR (reverse) 5' GACCGTGCCGTCGATGTACAGC<sup>3'</sup> que amplificaron un segmento de 552 pb.

Para la mezcla se utilizó un volumen final de 50 µl conteniendo: Buffer 5X (Promega), 5 mM de la mezcla de dNTP'S (Promega), 20 µM de cada primer (que se diluyeron 1/100 veces), 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 U/ml de la enzima Taq DNA polimerasa (Promega), 5 µl de ADN y 30 µl de agua bidestilada hasta completar el volumen final.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Gene Amp 2400; Perkin-Elmer) con un programa de 30 ciclos compuesto por una desnaturalización inicial (94° C durante 5 min), desnaturalización (95 °C durante 1 min), annealing (55 °C durante 1 min), extensión (72 °C durante 2 min) y extensión final (72 °C durante 7 min). Finalmente los productos de la amplificación fueron separados mediante electroforesis a

100 volts en un gel de agarosa al 2 % preparado con bromuro de etidio y luego fueron visualizados mediante luz ultravioleta en un transiluminador (UV Transilluminator, UVP).

### 3.10.3. Protozoos

#### 3.10.3.1. *Neospora caninum*

El diagnóstico de *N. caninum* se realizó mediante el análisis histopatológico (3.4), las técnicas de IHQ (3.5.1), IFI (3.7.1) y PCR. Las muestras seleccionadas para PCR fueron el SNC y en algunos casos, muestras de hígado, las cuales se procesaron de acuerdo al siguiente orden:

- 1) SNC de 11 fetos con lesiones histopatológicas compatibles a *N. caninum* (encefalitis multifocal necrotizante) y con IHQ positiva.
- 2) SNC de 6 fetos con IFI positiva (acompañados en algunos casos con lesión histopatológica en SNC como meningitis o en otros órganos).
- 3) SNC de 42 fetos con diagnóstico indeterminado por las técnicas convencionales de laboratorio (aislamiento, histopatología, IFI, IHQ) (Tabla 13).

Como controles positivos se emplearon: taquizoítos y ADN de SNC de un feto con diagnóstico positivo a *N. caninum* por IHQ y para el control negativo, agua bidestilada. Se utilizaron dos métodos de extracción: el primero en base a trabajos realizados por Walsh et al., (1991) mediante el empleo de Chelex 100 ® (Apéndice 10) y el segundo mediante el empleo de Qiagen.

Para PCR se tomo como referencia un trabajo realizado por Bazler et al., (1999) con algunas modificaciones en el que se emplearon el par de primers NP4 5'CCTCCCAATGCGAACGAAA<sub>3</sub>; y NP7 5'GGGTGAACCGAGGGAGTTG<sub>3</sub>, (275 bp) y para el seminested los primers NP6 5'CAGTCAACCTACGTCTTCT<sub>3</sub>, y NP7 (227 bp). El volumen final de la mezcla fue de 50 µl conteniendo Buffer 5X (Green GoTaq Buffer, Promega) (50 mM KCl, 10mM Tris-HCl, 0,1% Triton X-100 y 7,5 mM Cl<sub>2</sub>Mg), 10 pmol de cada primer (NP4/NP7), 0,2 mM de la mezcla de dNTP (Promega), 2U de la enzima Taq DNA polimerasa (Promega), 5 µl de ADN y agua bidestilada hasta completar el volumen final.

Para la amplificación se utilizó un termociclador (Gene Amp 2400; Perkin-Elmer) con un programa de 35 ciclos compuesto por desnaturalización inicial (95 °C

durante 5 min), desnaturalización (95 °C durante 30 seg), annealing (56,5 °C durante 30 seg), extensión (72 °C durante 60 seg) y extensión final (72 °C durante 5 min). En la PCR seminested el volumen final fue 50 µl; se utilizaron 2 µl del producto amplificado y los componentes de la mix fueron los mismos que para la PCR común a diferencia de los primers (se emplearon NP6 y NP7). Las condiciones de amplificación en el termociclador (Gene Amp 2400; Perkin-Elmer) fueron similares a la utilizada en la PCR común, a excepción del annealing que se realizó a 56 °C durante 30 seg. Los productos amplificados fueron separados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2 % con bromuro de etidio y visualizados mediante luz ultravioleta en un transiluminador (UV Transilluminator, UVP).

### 3.10.3.2. *Tritrichomona foetus*

Para el diagnóstico de *T. foetus* como agente involucrado en el aborto bovino se realizó el cultivo (3.2), histopatología (3.4), IHQ (3.5.3) y la técnica de PCR.

Se seleccionaron muestras de pulmón y contenido de abomaso de los fetos (n: 2) con aislamiento previo, las cuales fueron conservadas a -70 °C hasta su procesamiento. Para adecuar la técnica de PCR se utilizaron cepas controles provenientes de fetos bovinos abortados por *T. foetus*, cepa de *T. foetus* 339, (cepario del Dr. C. Campero, INTA Balcarce). Como control negativo se empleó agua bidestilada. Para la extracción del ADN se emplearon varios protocolos: lisis con proteinasa K (BonDurant et al., 2003), extracción con fenol-cloroformo isoamílico (Apéndice 4), con Trizol (Gibco) (Apéndice 11) y con Qiagen. También se realizó la extracción de ADN a partir de tacos de parafina (Apéndice 5 y con Qiagen) en muestras de intestino y pulmón de los 2 fetos mencionados. Se realizó una PCR multiplex utilizando los primers según Campero et al., 2003: TFR1 5'-TGCTTCAGTTCAGCGGGTCTTCC-3' y TFR2 5'-CGGTAGGTGAACCTGCCGTTGG-3' (162 bp) específicos del género *Trichomona* y los primers TFR3 5'-CGGGTCTTCTATATGAGACAGAACC-3' y TFR4 3'-CCTGCCGTTGGATCAGTTTCGTTAA-3' (347 bp) específicos de *T. foetus*.

El protocolo de PCR se realizó de acuerdo al trabajo de BonDurant et al., 2003 con algunas modificaciones. El volumen final de la mezcla fue 50 µl conteniendo 5µl de buffer 10X (Promega), 15mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM de la mezcla de dNTP (Promega), 20 pmol de cada primer (TFR1/TFR2/TFR3/TFR4), 4U de la enzima Taq DNA polimerasa (Promega), 5 µl de ADN y agua ultrapura hasta completar el volumen final. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Gene Amp 2400; Perkin-Elmer) con

un programa de 40 ciclos compuesto por una desnaturalización inicial (94 °C durante 5 min), desnaturalización (94 °C durante 30 seg), annealing (67 °C durante 30 seg) extensión (72 °C durante 90 seg) y extensión final (72 °C durante 15 min). Finalmente los productos de la amplificación fueron separados mediante electroforesis a 100 volts en un gel de agarosa al 2 % preparado con bromuro de etidio y se visualizaron mediante luz ultravioleta en un transiluminador (UV Transilluminator, UVP).

### **3.11. CAUSAS DETERMINADAS NO INFECCIOSAS**

Se incluyeron en ésta categoría a las causas de origen genético (anormalidades de los cromosomas o de los genes) y ambiental como abortos de origen traumático, tóxicos, por pesticidas, hormonales, nutricionales (carencias minerales y vitamínicas), exceso de nitratos, temperaturas elevadas, factores mecánicos (torsión uterina, compresión del cordón umbilical) y la presencia de mellizos (Kirkbride, 1992, Corbellini et al., 2006).

### **3.12. CAUSAS INDETERMINADAS**

Se consideraron aquellos casos en los que no se pudo arribar a un diagnóstico etiológico por las técnicas convencionales de laboratorio. Las causas indeterminadas pueden o no presentar lesiones histopatológicas. Cuando están presentes sugieren la intervención de un probable agente infeccioso (Corbellini et al., 2006).

### **3.13. ANALISIS ESTADISTICO**

Para analizar si existieron diferencias significativas entre las causas de aborto y los tipos de explotación en los distintos trimestres gestacionales, se utilizó el Modelo lineal generalizado con distribución poisson (Proc. Gen. Mod) (SAS, 2002).

La prueba de  $\chi^2$  (Proc. Freq) (SAS, 2002) se utilizó para comprobar la existencia de diferencias significativas entre las causas determinadas e indeterminadas y entre las causas determinadas, con y sin lesión histopatológica. Las diferencias se consideraron significativas para los valores de  $P < 0,05$ .

#### 4. RESULTADOS

En el presente trabajo se analizaron 150 fetos bovinos provenientes de 77 establecimientos ubicados en la provincia de Buenos Aires, 2 en San Luis y 4 en Córdoba. Del total de especímenes, 104 (69,2%) provenían de rodeos para carne de las razas Aberdeen Angus, Hereford y sus cruces y 35 (23,4%) de rodeos lecheros raza Holando Argentino y Jersey. En 11 fetos (7,4%) no se registró el origen. El número de abortos procedentes de rodeos para carne fue significativamente mayor ( $P<0,05$ ) que el de los rodeos para leche (Tabla 3). Al determinar el sexo, 76 (50,6%) fetos fueron machos y 58 (38,6%) hembras mientras que en 16 (10,6%) oportunidades no se consignaron los datos.

Por otro lado, se obtuvieron antecedentes de los rodeos en el 73% de los casos remitidos y se registró además el grado de autólisis fetal obteniéndose los siguientes resultados: el 61% de los fetos presentó autólisis moderada (grado 2) o severa (grado 3), mientras que en el 22% de los casos la autólisis fetal fue leve (grado 1) y en el 24% restante no hubo registro de estos datos.

Al analizar la presentación de los principales agentes infecciosos involucrados en los abortos, se observaron diferencias significativas ( $P<0,05$ ) entre las causas bacterianas y por protozoos contra las demás causas (hongos, virus, etc) (Tabla 2). La mayor cantidad de abortos se registró en el tercer trimestre de la gestación (Tabla 2). En este período aumentaron en proporción las causas bacterianas y otras (hongos, virus, etc) mientras que disminuyeron las causas por protozoos (Tabla 2) (Fig. 8). Se observaron diferencias significativas ( $P<0,05$ ) entre los abortos provenientes de rodeos para carne y leche, siendo menor en estos últimos (Tabla 3). En ambos tipos de explotación se observaron diferencias significativas entre el primer trimestre de gestación versus el segundo y tercer trimestre de gestación (Tabla 3).

Causas	1° trimestre	2° trimestre	3° trimestre	*sin datos	Total
<b>Bacterias</b>	0	14	28	--	<b>42<sup>a</sup></b>
<b>Protozoos</b>	0	14	10	--	<b>24<sup>a</sup></b>
<b>Otras</b>	5	29	42	8	<b>84<sup>b</sup></b>
<b>Total</b>	<b>5<sup>d</sup></b>	<b>57<sup>e</sup></b>	<b>80<sup>e</sup></b>	<b>8</b>	<b>150</b>

**Tabla 2. Relación entre las causas de aborto en 150 fetos bovinos por bacterias, protozoos y otras según trimestre de gestación.**

Otras: incluyen: hongos, virus, causas no infecciosas, causas indeterminadas

Letras diferentes en la misma columna (a-b) o fila (d-e) poseen diferencias significativas ( $P<0,05$ ).

\*Datos no incluidos en el análisis estadístico.

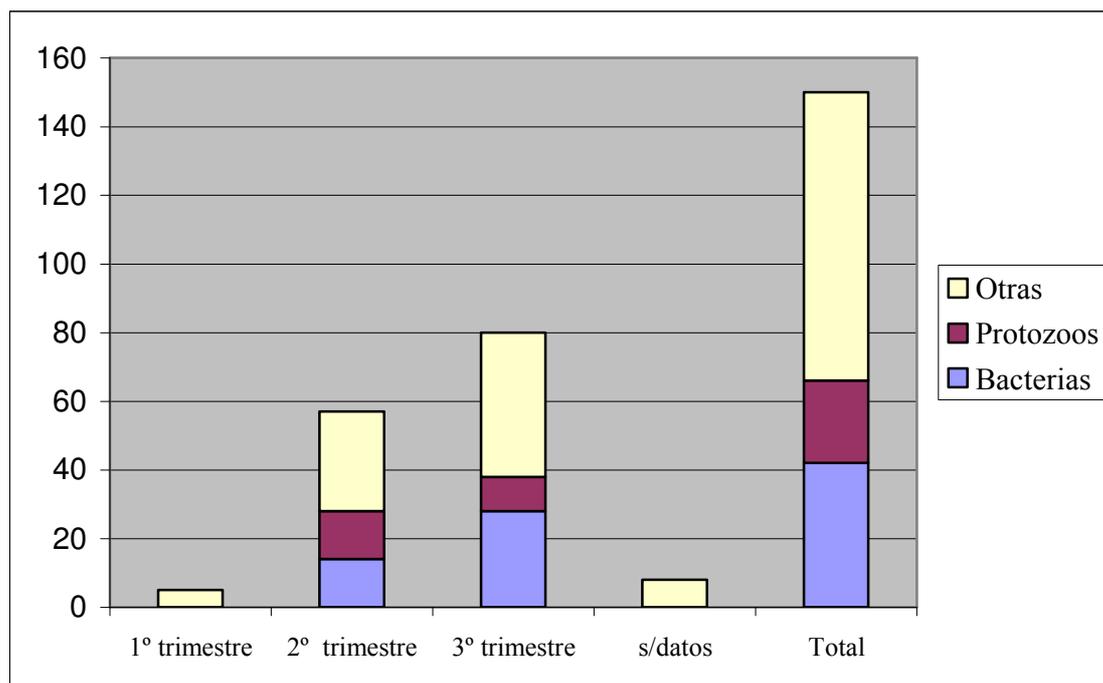


Fig. 8. Causas de aborto en 150 fetos bovinos según trimestre de gestación.

Sistema de producción	1º trimestre	2º trimestre	3º trimestre	*sin datos	total
Carne	1 <sup>d</sup>	33 <sup>e</sup>	64 <sup>e</sup>	1	99 <sup>a</sup>
Leche	3 <sup>d</sup>	16 <sup>e</sup>	12 <sup>e</sup>	5	36 <sup>b</sup>
sin datos	1	8	4	2	15
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>57</b>	<b>80</b>	<b>8</b>	<b>150</b>

Tabla 3. Origen de los especímenes según sistema de producción y el trimestre de la gestación sobre 150 abortos bovinos.

Letras diferentes en la misma columna (a-b) o fila (d-e) poseen diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

\*Datos no incluidos en el análisis estadístico

#### 4.1. CAUSAS DETERMINADAS INFECCIOSAS

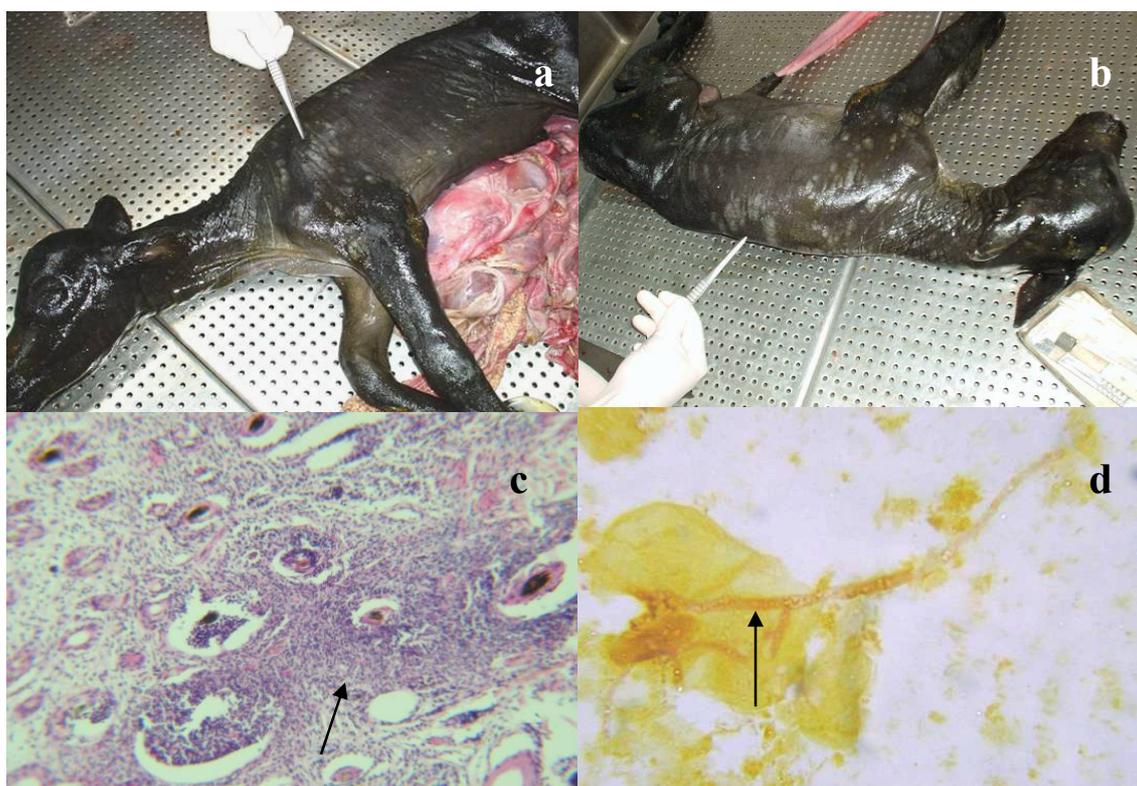
El diagnóstico etiológico se determinó en 75/150 (50%) especímenes siendo las causas más frecuentes las de origen infeccioso (69/150) (Tabla 4).

<b>Abortos</b>	<b>2004</b>	<b>2005</b>	<b>2006</b>		<b>%</b>
<b>Causas determinadas</b>	<b>total: 41</b>	<b>total: 29</b>	<b>total: 5</b>	75	<b>50,0%</b>
Agentes infecciosos	<b>total: 38</b>	<b>total: 26</b>	<b>total: 5</b>	69	<b>46,0%</b>
a) Bacterias	<b>total: 25</b>	<b>total: 14</b>	<b>total: 3</b>	42	<b>28,0%</b>
	<i>A. pyógenes</i>	1	1	-	
	<i>A. hydrophila</i>	1	-	-	
	<i>B. abortus</i>	1+ (2)	4+ (1)	1+ (1)	
	<i>C. fetus</i>	8	5	1	
	<i>Leptospira spp.</i>	8	3	-	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	1	-	-	
	<i>Streptococcus alfa hemolítico</i>	3	-	-	
b) Protozoos	<b>total: 10</b>	<b>total: 12</b>	<b>total: 2</b>	24	<b>16,0%</b>
	<i>N. caninum</i>	3+ (5)	7+ (5)	1+ (1)	
	<i>T. foetus</i>	2	-	-	
c) Hongos	<b>total: 1</b>	<b>total: 0</b>	<b>total: 0</b>	1	<b>0,7%</b>
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	1	-	-	
d) Virus	<b>total: 2</b>	<b>total: 0</b>	<b>total: 0</b>	2	<b>1,3%</b>
	vDVB	2	-	-	
	HVB	-	-	-	
Agentes no infecciosos	<b>total: 3</b>	<b>total: 3</b>	<b>total: 0</b>	6	<b>4,0%</b>
	Malformación congénita	1	3	-	
	Iatrogénico	2	-	-	
<b>Causas indeterminadas</b>	<b>total: 29</b>	<b>total: 35</b>	<b>total: 11</b>	75	<b>50,0%</b>
Con lesiones histológicas	15	19	7		
Sin lesiones histológicas	14	16	4		

**Tabla 4. Diagnóstico del aborto en 150 fetos bovinos**

De las 69 causas infecciosas diagnosticadas, 15 se identificaron con el auxilio de la técnica de PCR (*B.abortus*: 4 casos, *N. caninum*: 11 casos) en los fetos con diagnóstico indeterminado por las técnicas convencionales de laboratorio (cultivo, IF,

IHQ). El resto de los fetos se identificaron por cultivos microbiológicos (27 causas bacterianas (ver punto 4.1.1) y 2 casos de *T. foetus*), cultivos virológicos (2 casos vDVB), IFD (11 casos *Leptospira spp.*), histopatología e IHQ (11 casos de *N. caninum*) y finalmente 1 caso de aborto micótico (*A. fumigatus*) fue diagnosticado por la presencia de lesiones macroscópicas (Fig. 9-a) (Fig. 9-b) e histopatológicas (Fig. 10), por la observación de las hifas del hongo con la tinción especial de Grocott, (Fig. 11) y confirmado por aislamiento en el Área de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de Tandil (UNCPB).

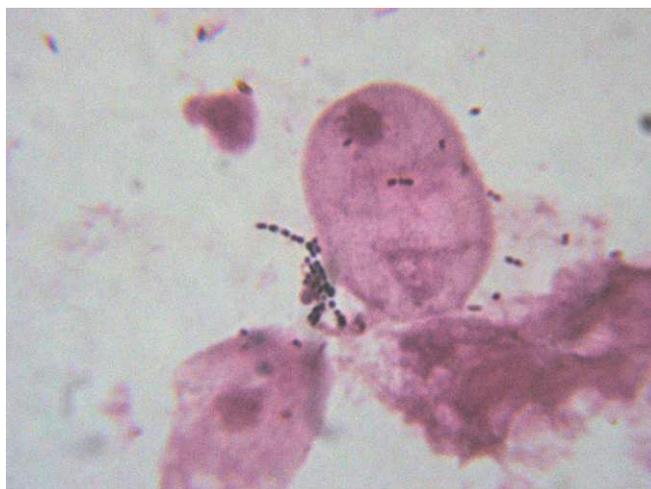


**Fig. 9.** Lesiones macroscópicas y microscópicas de un feto bovino abortado por *A. fumigatus*. Fig. 9(a). Alopecia multifocal en miembro anterior y tórax. Fig. 9(b). Alopecia multifocal en zona dorsal. Fig. 10. Folliculitis mononuclear severa (flecha). H-E (10X). Fig. 11. Hifas (flecha) de *A. Fumigatus*. Grocott (40X)

#### 4.1.1. Cultivos microbiológicos y frotis de contenido abomasal

El cultivo microbiológico se realizó en 129 especímenes debido a que algunos fetos estaban depredados o presentaban un elevado grado de autólisis; obteniéndose agentes infecciosos en 29/129 (22,4%) fetos: *C. fetus* (14 casos), *B. abortus* (6 casos), *Arcanobacterium pyogenes* (2 casos), *Aeromona hydrophila* (1 caso), *Listeria monocytogenes* (1 caso), *Streptococcus* alfa hemolítico (3 casos), *T. foetus* (2 casos).

En los frotis de contenido abomasal teñidos con la coloración de Gram se observaron diversas formas bacterianas (cocos, diplococos y bacilos Gram positivos, bacilos pleomórficos Gram negativos, etc), algunas de ellas correspondientes a agentes infecciosos como *Streptococcus α hemolítico* (Fig. 12), *C. fetus sp*, etc.



**Fig. 12. Cocos Gram positivos (*Streptococcus α hemolítico*) obtenidos de frotis de contenido abomasal. Gram (100X-inmersión)**

#### 4.1.2. Bacterias

##### 4.1.2.1. *Brucella abortus*

*B. abortus* fue diagnosticada mediante cultivo en 6/129 (4,6%) fetos y posteriormente por PCR en 4/53 pulmones de los fetos con diagnóstico indeterminado (Tabla 5). Los fetos pertenecían 6 a rodeos para carne, 3 a rodeos lecheros y en un caso no se pudo identificar el origen. El promedio de edad gestacional de los fetos abortados fue de 7,8 meses (rango de 6 a 9 meses). En la necropsia se observó en un feto la presencia de fibrina y adherencias en la cavidad torácica (Fig. 13); mientras que en la histopatología los principales hallazgos fueron: bronconeumonía mixta (Fig. 14-a), pericarditis no supurativa (Fig. 14-b), meningitis no supurativa (Fig. 14-c) y enteritis intersticial no supurativa (Fig. 14-d). Los 4 fetos con diagnóstico positivo a *B. abortus* por PCR presentaron lesiones en pulmón de neumonía intersticial o bronconeumonía.



Fig. 13. Presencia de fibrina y adherencias en la cavidad torácica de un feto bovino de 6 meses abortado por *B. abortus*.

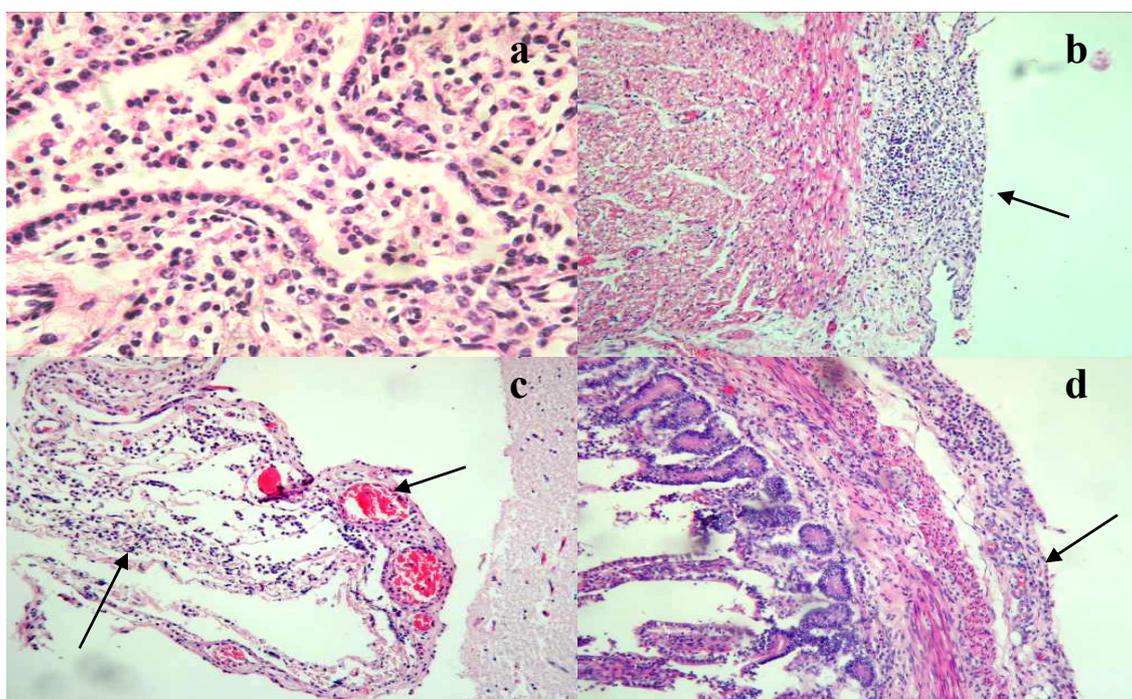


Fig. 14. Microfotografía de varios órganos de fetos bovinos abortados por *B. Abortus*. Fig. 14(a). Bronconeumonía mixta. H-E (40X). Fig. 14(b). Pericarditis no supurativa (flecha). H-E (10X). Fig. 14(c). Meningitis no supurativa (flecha) y congestión (flecha). H-E (10X). Fig. 14(d). Enteritis intersticial no supurativa (flecha). H-E (10X).

En los 6 fetos con aislamiento positivo, el diagnóstico fue confirmado con la prueba de IHQ en 4/6 oportunidades (Tabla 5) (Fig. 15-a) (Fig. 15-b) y con PCR en 4/6 fetos (Tabla 5) (Fig. 16); mientras que en 1/6 fetos ambas técnicas resultaron negativas (Tabla 5).

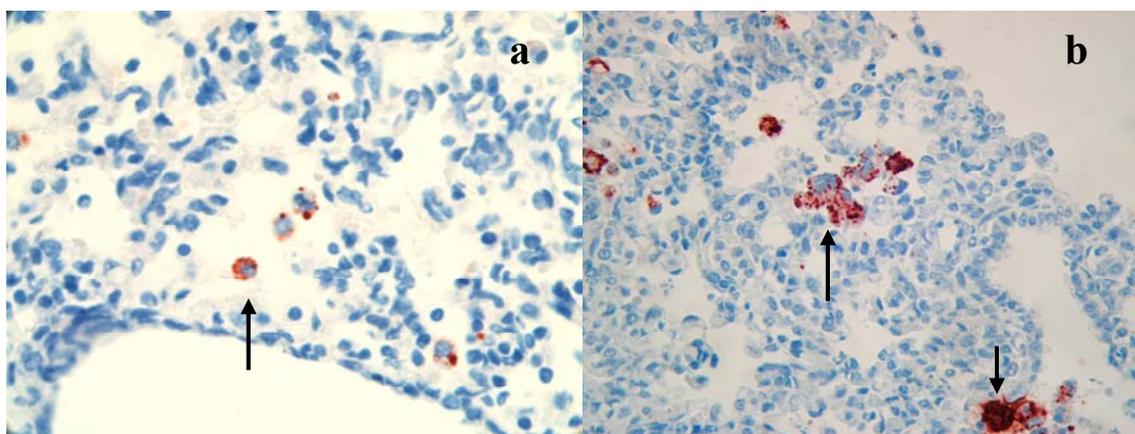
Identificación	Cultivo	IHQ	PCR
04/542 <sup>(a)</sup>	+	intestino+	+ (CA)
05/256 <sup>(a)</sup>	+	pulmón + intestino -	+ (CA)
05/640 <sup>(a)</sup>	+	pulmón - intestino +	+ (CA)
05/691 <sup>(a)</sup>	+	pulmón + intestino +	- (CA)
05/705 <sup>(a)</sup>	+	pulmón + intestino +	+ (CA)
06/161 <sup>(a)</sup>	+	pulmón + intestino -	- (CA)
04/332 <sup>(b)</sup>	-	pulmón -	+ (P) - (CA)
04/718 <sup>(b)</sup>	-	-	+ (P) - (CA)
05/673 <sup>(b)</sup>	-	-	+ (P) - (CA)
06/22 <sup>(b)</sup>	-	-	+ (P) - (CA)

**Tabla 5: fetos abortados con diagnóstico de *B. abortus* por cultivo, PCR e IHQ.**

Referencias: IHQ: inmunohistoquímica; PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa, nr: no realizado por falta de muestra; CA: contenido de abomaso; P: pulmón.

<sup>(a)</sup> Fetos con diagnóstico positivo a *B. abortus* por cultivo y confirmados por IHQ y PCR.

<sup>(b)</sup> Fetos con diagnóstico indeterminado (negativos a *B. abortus* por cultivo) que luego resultaron positivos por PCR en muestras de P y negativos en LA.



**Fig. 15. Microfotografía de pulmón de un feto bovino abortado por *B. abortus*. IHQ. Fig. 15(a). Antígenos de *B. abortus* en interior de alvéolos (flecha). IHQ (40X). Fig. 15(b). Antígenos de *B. abortus* en interior de bronquiolos (flechas). IHQ (40X).**

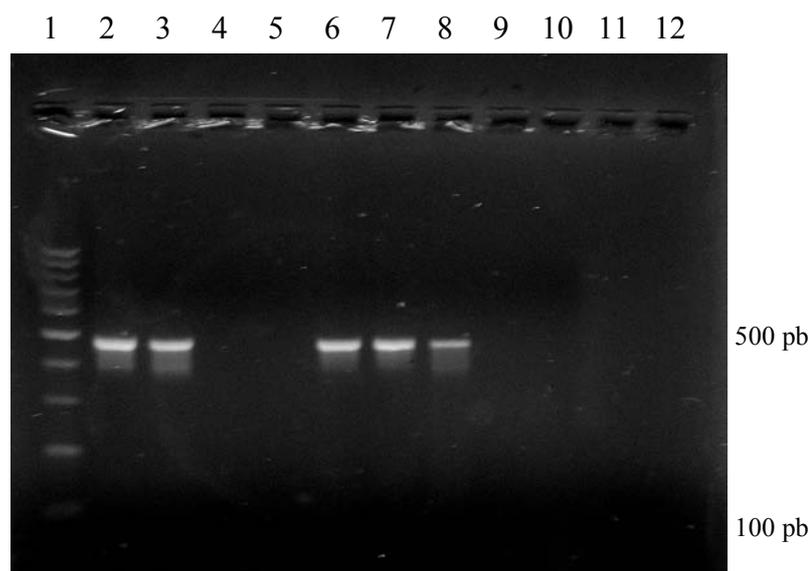


Fig. 16. Productos de PCR de *B. abortus* . Primers IS 711/All Bru (498 pb). Gel de agarosa teñido con Bromuro de etidio. (1) marcador molecular (100pb). (2) control positivo (cultivo *B. abortus*). (3, 6, 7 y 8) fetos positivos a *B. abortus* (4 y 5) fetos negativos a *B. abortus* (10) control negativo (agua bidestilada) (11 y 12) sin muestra.

Estos resultados de PCR solamente fueron positivos cuando se empleó para la extracción de ADN el kit Qiagen (Tabla 6). En base a esto, se utilizó el mismo kit en los fetos con diagnóstico indeterminado; resultando 38 muestras de contenido de abomaso negativas y 4/53 pulmones fetales positivos (Tabla 5, Tabla 6). Los 4 fetos fueron positivos por PCR a *B. abortus* en muestras de pulmón, pero negativos en muestras de contenido de abomaso.

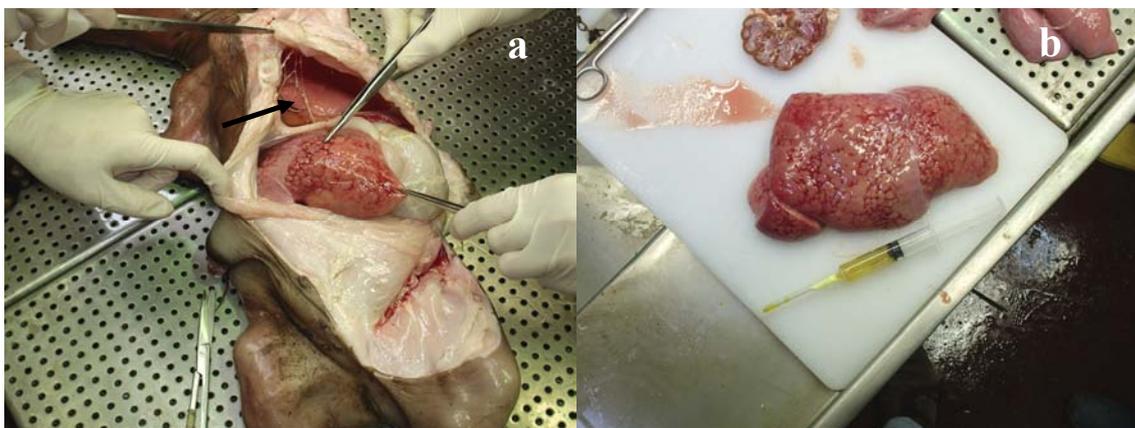
	<b>Cantidad y tipo de muestra</b>	<b>Métodos de extracción</b>	<b>Resultados</b>
<i>B. abortus</i>	Cultivo puro	Isopropanol	- El cultivo puro y 4/6 CA fueron positivos solo con Qiagen. Con los otros métodos dieron resultados negativos.
	6 CA de fetos con aislamiento positivo	Fenol-cloroformo-isoamílico	
	53 P y 38 CA de fetos con diagnóstico indeterminado	Qiagen	-38 CA negativos y 4/53 P positivos con Qiagen.

Tabla 6. Resultados de PCR en fetos controles y fetos con diagnóstico indeterminado según muestras y métodos de extracción.

Referencias: CA: contenido de abomaso; P: pulmón.

#### 4.1.2.2. *Campylobacter fetus*

*C. fetus* fue la bacteria aislada con mayor frecuencia (14 casos). Del total de fetos, 12 provenían de rodeos para carne, 1 de un rodeo lechero y en un caso no se pudo establecer el origen. El promedio de edad gestacional de los fetos abortados fue de 6,5 meses (rango de 5,5 a 9 meses). En la necropsia se observó que un feto (1/14) presentaba adherencias en la cavidad torácica con presencia de fibrina y el hígado con aspecto nodular en la superficie y aumentado de tamaño (Fig. 17-a) (Fig. 17-b); mientras que en los restantes especímenes no se observaron lesiones aparentes.



**Fig. 17. Lesiones macroscópicas en un feto bovino de 6 meses abortado por *C. fetus spp.* Fig. 17(a). Presencia de adherencias en cavidad torácica (flecha) e hígado aumentado de tamaño y con la superficie de aspecto nodular. Fig. 17(b). Hígado con aspecto nodular en la superficie.**

Algunos de los hallazgos histopatológicos que se observaron en los fetos fueron: bronconeumonía no supurativa (Fig. 18-a), miocarditis intersticial no supurativa (Fig. 18-b), neumonía intersticial mixta (Fig. 18-c) (Fig. 18-d), enteritis basal intersticial no supurativa (Fig. 19-a) (Fig.19-b), placentitis con vasculitis necrotizante (Fig. 19-c) y timitis intersticial no supurativa (Fig.19-d).

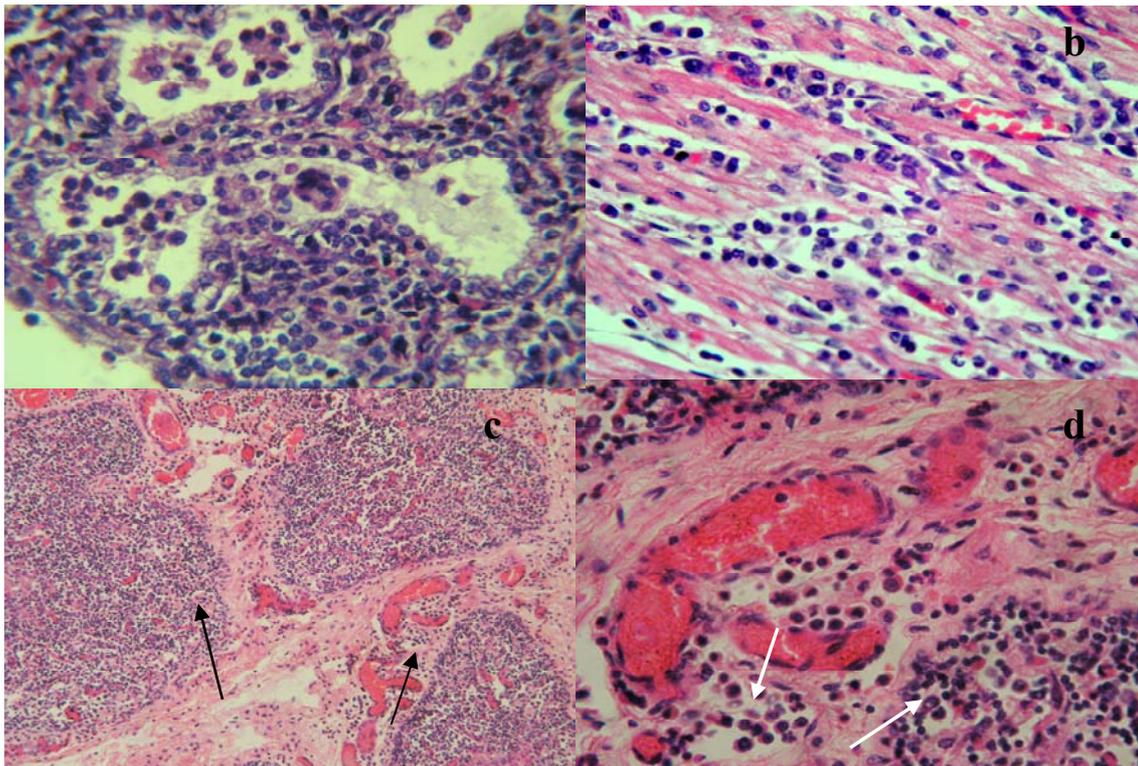


Fig. 18. Microfotografía de varios órganos de fetos bovinos abortado por *C. fetus spp.* Fig. 18 (a). Bronconeumonía no supurativa. H-E (40X). Fig. 18(b). Miocarditis intersticial no supurativa. Fig. 18(c). Neumonía intersticial mixta (Flechas). H-E (10X). Fig. 18(d). Neumonía intersticial mixta (flecha). H-E (40X)

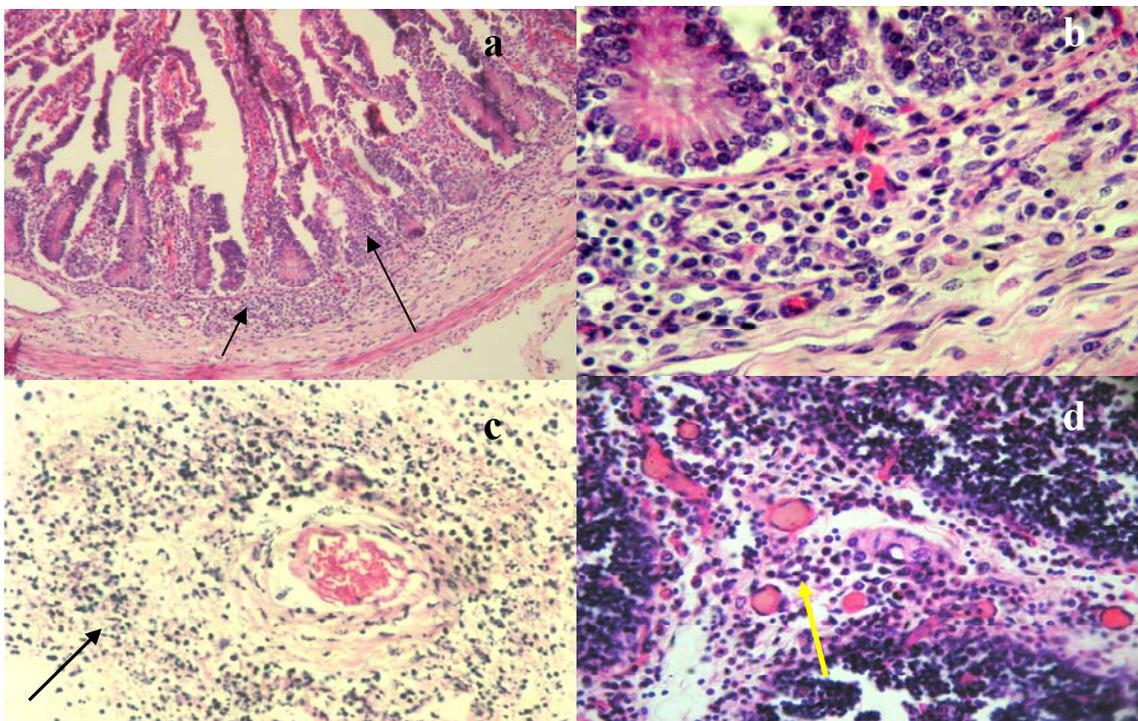
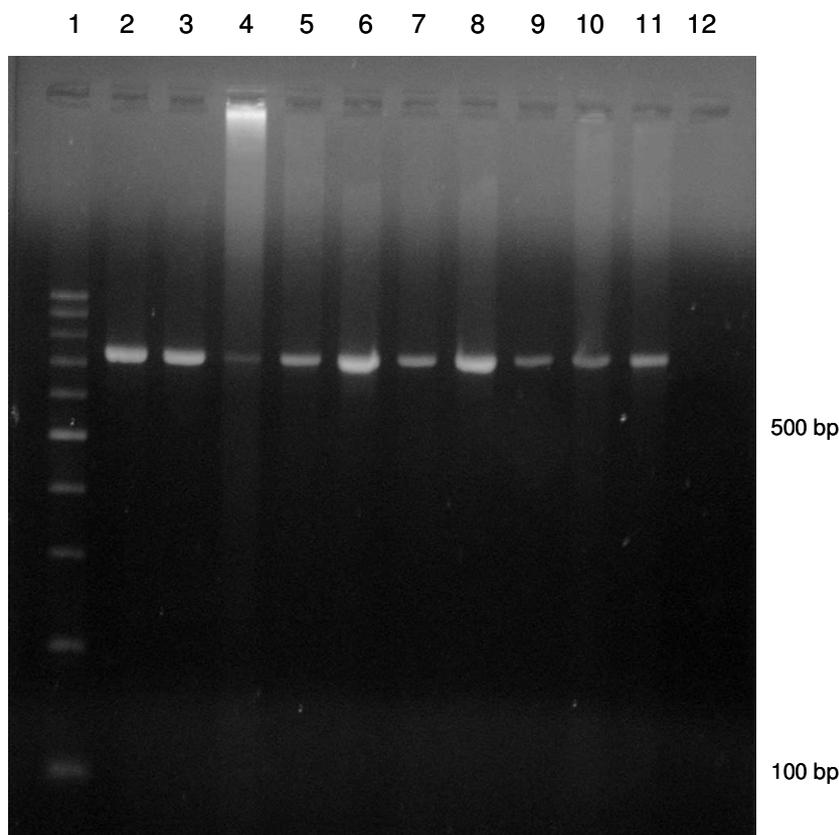


Fig. 19. Microfotografía de varios órganos de fetos bovinos abortados por *C. fetus spp.* Fig. 19(a). Enteritis basal intersticial no supurativa (flechas). H-E. (10X). Fig. 19(b). Enteritis basal intersticial no supurativa. H-E. (40X). Fig. 19(c). Placentitis con vasculitis necrotizante (flecha). H-E. (10X). Fig. 19(d). Timitis intersticial no supurativa (flecha). H-E (10X).

El diagnóstico se determinó mediante IFD y aislamiento en 14/129 (10,8%) fetos y posteriormente fue confirmado por IHQ y PCR, observándose correlación entre ambas técnicas (Tabla 7). De estos 14 fetos resultaron positivas a la IHQ 10 muestras de intestino, 12 de pulmón y 1 de placenta (Tabla 7); mientras que con PCR fueron positivos 6/12 pulmones y 12/14 contenidos de abomaso (Tabla 7 y 8) (Fig. 20). Estas muestras y la cepa de referencia solo fueron positivas a PCR cuando se utilizó para la extracción del ADN el kit Qiagen; mientras que con isopropanol resultaron negativas (Tabla 8). Por este motivo se procesaron con el kit Qiagen 49 pulmones y 38 contenidos de abomaso de los fetos con diagnóstico indeterminado, siendo el resultado negativo en todos los casos (Tabla 8).

Identificación	Tipo de explotación	Edad fetal en meses	Prueba diagnóstica	
			IHQ*	PCR*
04/331	Carne	7	P: + I: +	P: + CA: +
04/517	Carne	7	P: + I: +	P: - CA: +
04/554	Carne	7.5	P: + I: +	P: - CA: +
04/701	Carne	5.5	P: + I: +	P: - CA: +
04/703	Carne	6	P: + I: -	P: + CA: +
05/434	Carne	6	P: + I: +	P: + CA: +
05/435	Carne	7	P: + I: +	P: - CA: +
05/735	Leche	7	P: + I: +	P: - CA: +
04/622	Carne	6	P: + I: +	P: - CA: +
04/240	Carne	5.5	P: + Pla: +	P: + CA: +
04/463	Carne	9	P: - I: -	P: nr CA: -
05/622	Carne	5.5	P: + I: +	P: + CA: +
05/794	Carne	6	P: + I: +	P: + CA: +
06/341	s/d	6	P: + I: +	P: nr CA: +

**Tabla 7: resultados de IHQ y PCR en tejidos y fluidos fetales con cultivo e IFD positiva a *C. fetus*.**  
Referencias: IHQ\*: inmunohistoquímica, PCR\*: Reacción en Cadena de la Polimerasa, P: pulmón, CA: contenido de abomaso, I: intestino, nr: no realizada por ausencia de muestra.



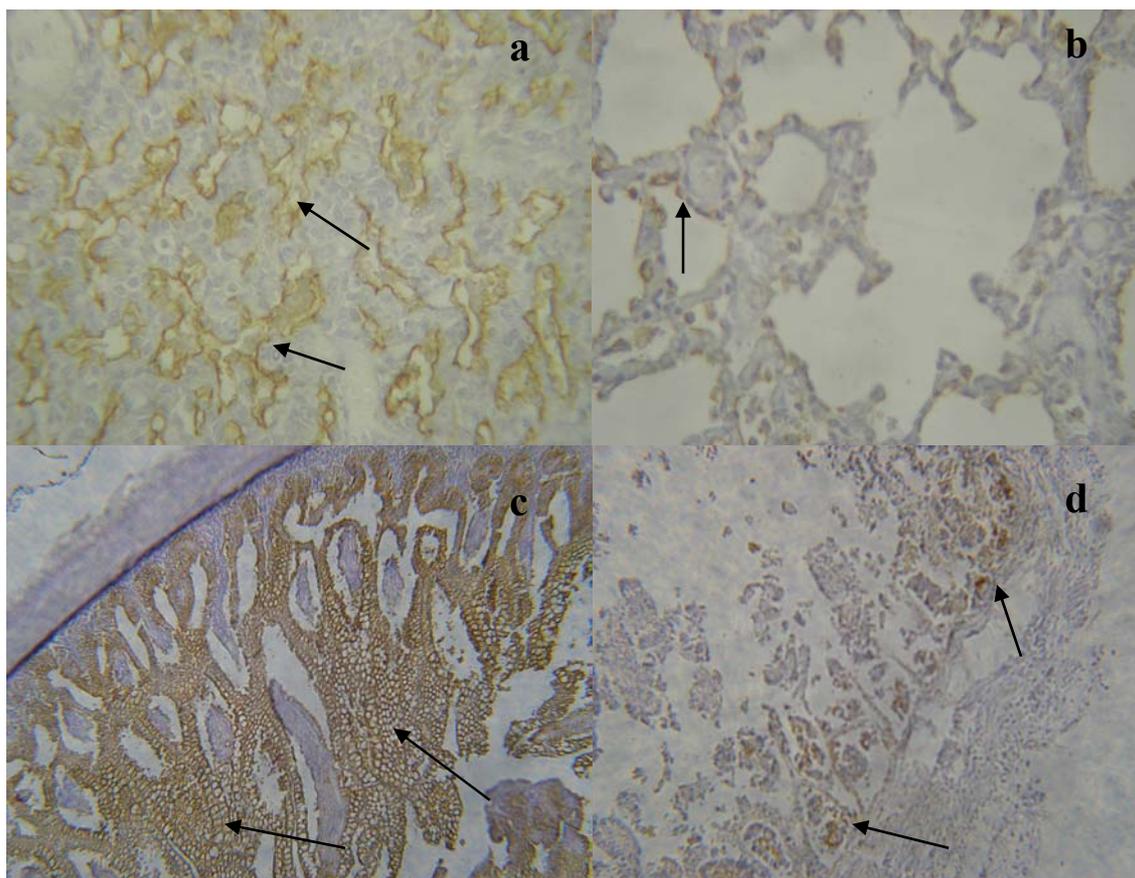
**Fig. 20. Productos de PCR de *C. fetus*. de contenidos de abomaso. Primers MG3F/MG4R ( $\pm 750$ bp). Gel de agarosa teñido con Bromuro de etidio. (1) marcador molecular (100pb). (2) control positivo (cultivo cepa de *C. fetus*). (3 a 11) fetos positivos a *C. fetus*. (12) control negativo (agua bidestilada)**

PCR	Cantidad y tipo de muestra	Métodos de extracción	Resultados
<i>C. fetus</i>	Cepa referencia	Isopropanol	- La cepa, 6/12 P y 12/14 CA fueron positivos solo con Qiagen.
	12 P y 14 CA de fetos con aislamiento e IFD positiva		
	49 P y 38 CA de fetos con diagnóstico indeterminado	Qiagen	- 49P y 38 CA negativos.

**Tabla 8. Resultados de PCR en fetos controles y fetos con diagnóstico indeterminado según muestras y métodos de extracción.**

Referencias: CA: contenido de abomaso; P: pulmón; IFD: inmunofluorescencia directa.

Con la técnica de lectinohistoquímica no se observaron importantes diferencias en el patrón de lectinas al analizar los fetos de los grupos controles negativos y los fetos con diagnóstico de *C. fetus*. El cambio más relevante fue la menor unión de las lectinas PNA y DBA a las células alveolares del pulmón y la fuerte unión de la lectina DBA en las células globosas de las vellosidades intestinales de los fetos infectados con *C. fetus* (Fig. 21-a), (Fig. 21-b), (Fig. 21-c) (Fig. 21-d).

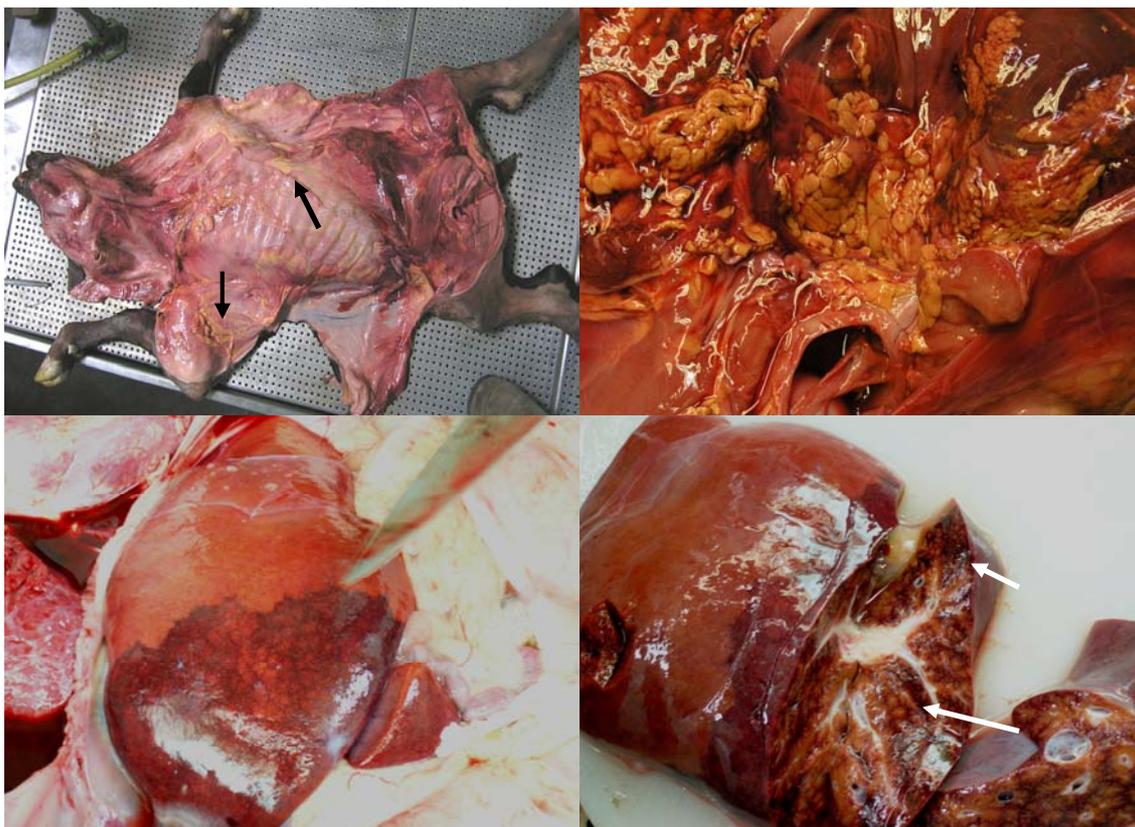


**Fig. 21.** Patrón de lectinohistoquímica en fetos bovinos abortados por *C. fetus*. Fig. 21(a) y Fig. 21(c). Unión fuerte de la lectina DBA en las células alveolares del pulmón (flechas) y en las células globosas del intestino (flechas). Fig. 21(b) y Fig. 21(d). Unión débil de la lectina DBA en las células alveolares del pulmón (flecha) y en las células globosas del intestino (flechas) de fetos controles negativos a *C. fetus*.

#### 4.1.2.3. *Leptospira* spp.

Fue diagnosticada en 11/ 150 (7,3 %) fetos mediante IFD (Fig. 24) en improntas de los siguientes órganos: riñones (3), pulmón (1) y riñón e hígado en conjunto (3) (Tabla 9) aunque en algunos casos el hígado fue descartado debido a la imposibilidad para observarlo en la IFD. En las muestras de humor acuoso, la IFD resultó positiva en 3 casos y en 1 caso el humor acuoso fue positivo junto con impronta

de riñón (Tabla 9). En la necropsia se observó en 6/11 fetos una coloración amarillenta (ictericia) en el subcutáneo (Fig. 22-a) y en grasa perirrenal (Fig. 22-b). En otro feto se observó un cambio de coloración (rojizo oscuro) en la superficie del hígado que abarcaba casi la mitad del órgano (Fig. 22-c) y al realizar un corte transversal presentaba un puntillado hemorrágico (Fig. 22-d). En los fetos restantes no se observaron lesiones aparentes.



**Fig.22.** Lesiones macroscópicas en feto bovino de 7 meses abortado por *Leptospira spp.* Fig. 22(a). Ictericia en el tejido subcutáneo (flechas). Fig. 22(b). Ictericia en grasa perirrenal. Fig. 22(c). Cambio de coloración en la superficie hepática (rojo oscuro) que abarca la mitad del órgano. Fig. 22(d). Corte transversal del hígado. Obsérvese el puntillado hemorrágico (flechas).

En los fetos con IFD positiva *Leptospira spp.* se observaron algunas de las siguientes lesiones histopatológicas: hepatitis multifocal necrotizante (Fig. 23-a) (Fig. 23-b), endocarditis y epicarditis no supurativa (Fig. 23-c) (Fig. 23-d), nefritis intersticial multifocal, meningitis no supurativa y neumonía intersticial severa.

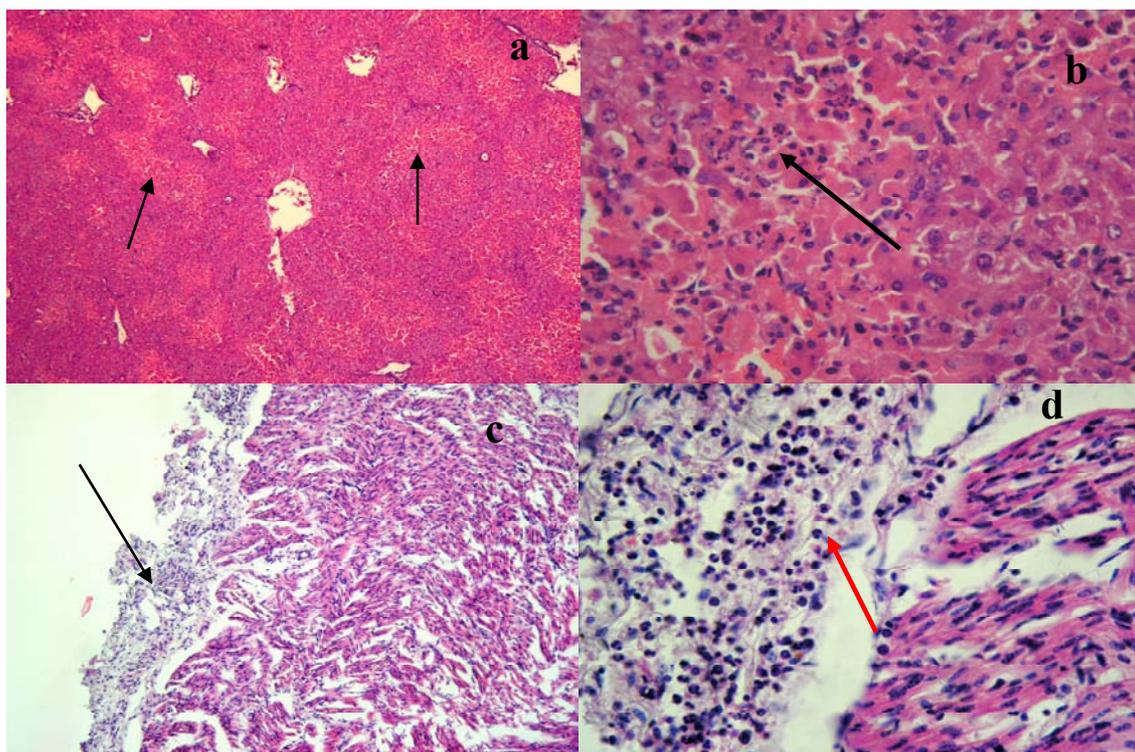
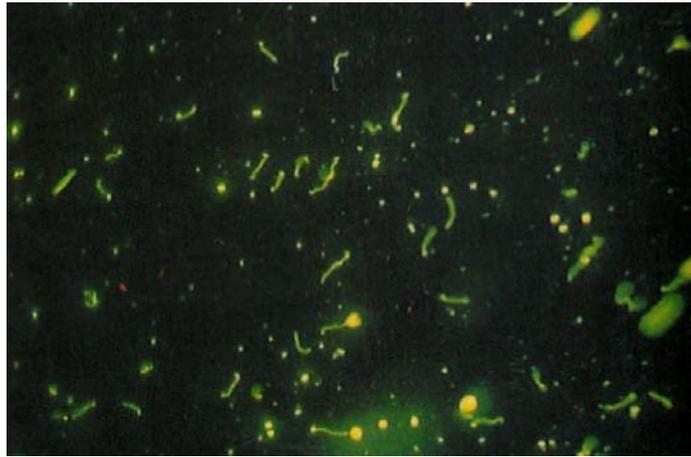


Fig. 23. Microfotografía de varios órganos de fetos bovinos abortados por *Leptospira spp.* Fig. 23(a). Hepatitis multifocal necrotizante (flechas). H-E. (10X). Fig. 23(b). Hepatitis multifocal necrotizante (flecha). H-E. (40X). Fig. 23(c). Epicarditis no supurativa (flecha). H-E- (10X). Fig. 23(d). Epicarditis no supurativa (flecha). H-E- (40X).

Identificación Feto N°	Riñón	Hígado	Pulmón	Humor acuoso
04-222	+	nr	-	-
04-244	-	nr	-	+
04-287	-	-	-	+
04-327	+	nr	-	+
04-454	+	nr	-	-
04-701	-	-	+	-
04-937	+	+	-	-
05-887	-	-	-	+
05-448	+	+	-	-
05-580	+	+	-	-
05-647	+	nr	-	-

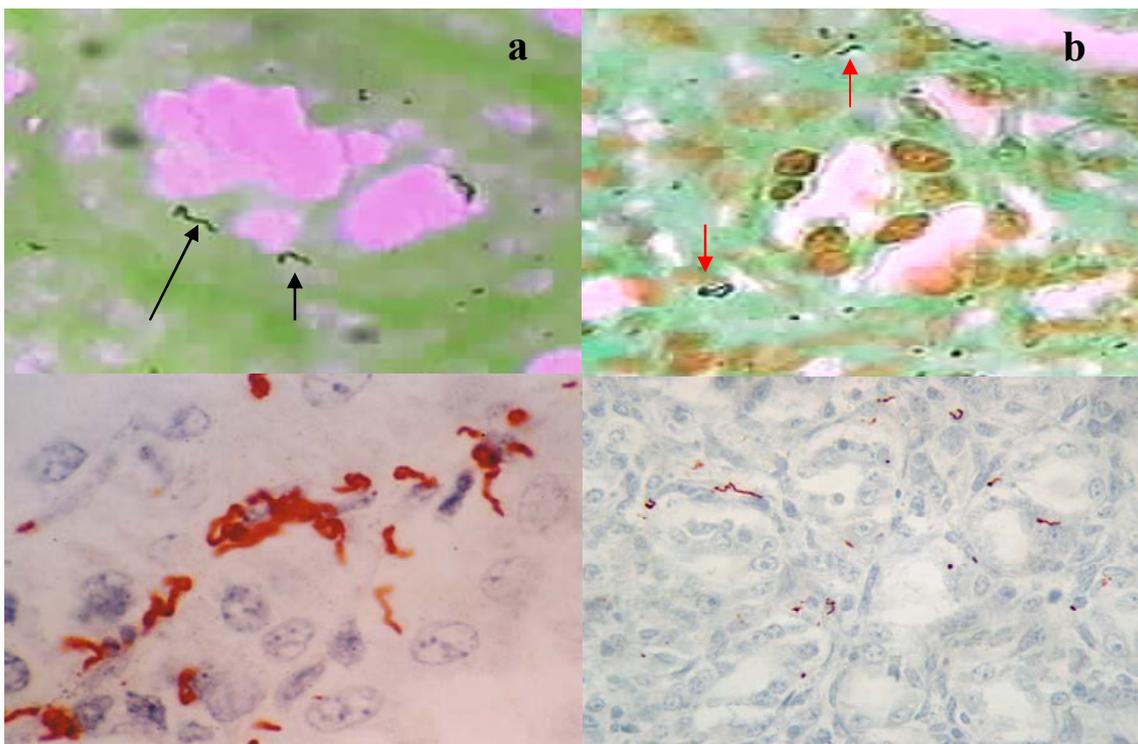
Tabla 9: IFD en órganos fetales y fluidos fetales para *Leptospira spp.*

Referencias: nr: no realizada



**Fig. 24. IFD de un cultivo puro de leptospiras utilizado como control positivo. (40X).**

Si bien se utilizaron diversos protocolos para la IHQ de *Leptospira spp.* (3.5.2) (Tabla 1) y se realizó la tinción especial de Warthin Starry en los fetos con IFD positiva los resultados obtenidos con ambas técnicas fueron inconsistentes y por ende no se implementaron en forma rutinaria. Con con la tinción especial de Warthin Starry la visualización de las espiroquetas fue dificultosa, observándose en algunos casos 1 ó 2 leptospiras/15 campos microscópicos (Fig. 25-a) (Fig. 25-b), mientras que con la IHQ solo se pudieron observar en algunos casos 4 ó 5 leptospiras/10 campos microscópicos (Fig. 25-c) (Fig. 25-d) cuando se utilizaron los protocolos N°3 y N°4 (Tabla 1)



**Fig. 25.** Tinción de Warthin Starry (WS) en tejidos fetales con diagnóstico a *Leptospira spp.* Fig. 25(a). Control positivo (flechas). Riñón. WS. (40X). Fig. 25(b). Caso positivo (flechas). Riñón. WS. (40X). Fig. 25(c). Control positivo. Riñón. IHQ. (100 X inmersión). Fig. 25(d). Caso positivo (flechas). Riñón. IHQ. (40X).

Con la técnica de PCR tampoco se obtuvieron resultados satisfactorios, pese a que se emplearon distintos protocolos, métodos de extracción y tipo de muestras (Tabla 10). Los controles positivos como: cultivos puros de leptospiras y tejidos de hamsters (bazo, hígado y riñón) inoculados experimentalmente con *L. pomona* solo se visualizaron en el gel cuando la extracción de ADN se realizó con el kit Qiagen (Tabla 10). Las muestras (congeladas, en parafina y en formol) de los fetos con diagnóstico por IFD positiva a *Leptospira spp.* fueron negativas a PCR con los distintos métodos de extracción incluyendo el kit Qiagen (Tabla 10). En base a estos resultados, la técnica de PCR para *Leptospira spp.* no se realizó en las muestras pertenecientes a los fetos con diagnóstico indeterminado.

PCR	Cantidad y tipo de muestra	Métodos de extracción	Resultados
<i>Leptospira spp.</i>	Cultivo puro leptospiras	Qiagen	- El cultivo puro y tejidos de hamsters solo fueron positivos con el Qiagen.
	Tejidos hamsters (B,H,R) inoculados con leptospira	Fenol-clororoformo-isoamílico. *1) *2)	
	H, R, P congelados, en parafina y en formol, HA y CA de fetos con IFD +	*3) Resina (se hizo en HA y CA)	- Los órganos congelados, en parafina y en formol, el HA y CA de los fetos con IFD + fueron negativos con todos los métodos de extracción mencionados
<i>Multiplex (B. abortus y Leptospira spp.)</i>	Controles positivos idem que para <i>B. abortus</i> y <i>Leptospira spp</i> respectivamente	Qiagen Tratamiento enzimático Ebullición	- Excepto los cultivos puros ( <i>B. abortus</i> y <i>Leptospira spp.</i> ) y los hamsters inoculados con <i>L. pomona</i> , el resto de los controles fueron negativos con los métodos de extracción mencionados.

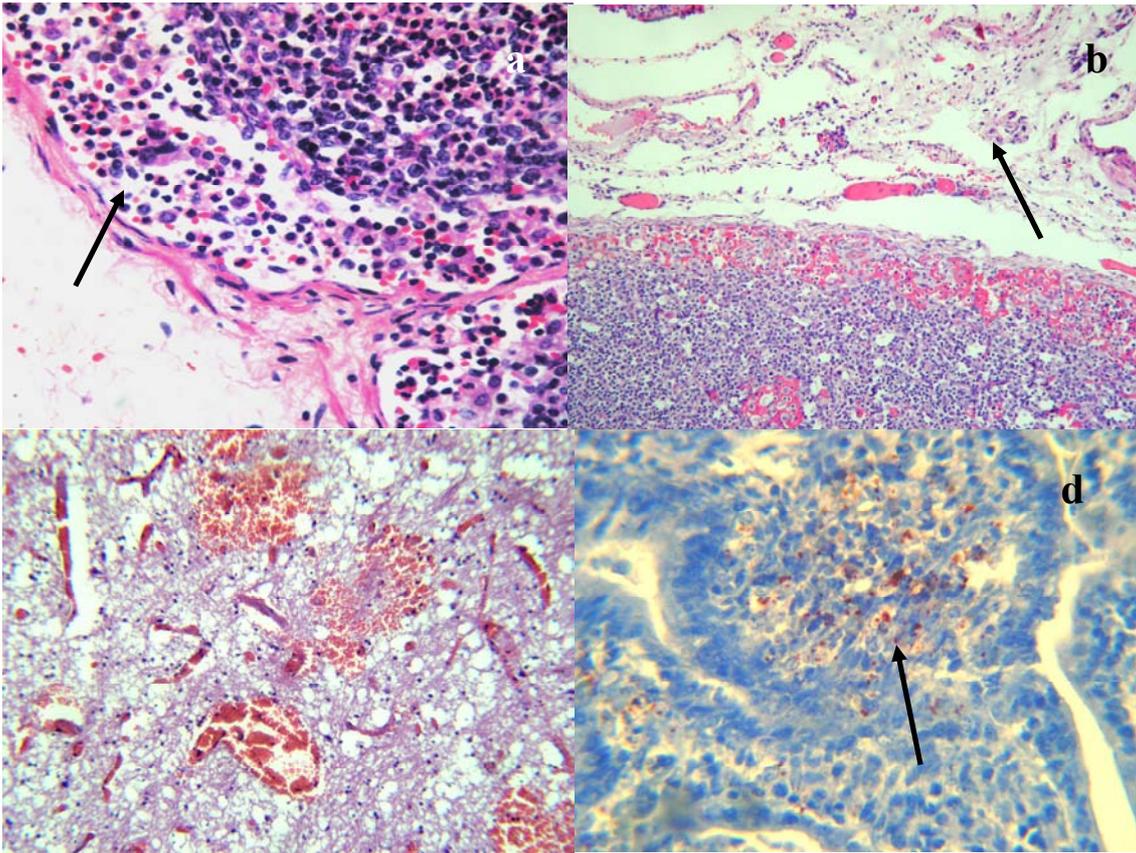
**Tabla 10. Resultados de PCR en fetos controles y fetos con diagnóstico indeterminado según muestras y métodos de extracción**

Referencias: B: bazo, H: hígado, R: riñón, P: pulmón, CA: contenido de abomaso, HA: humor acuoso, IFD: inmunofluorescencia directa, \*1) Extracción de ADN de parafina, \*2) Extracción de ADN de parafina con Qiagen, \*3) Extracción de ADN de formol.

Con respecto al PCR multiplex para *Brucella abortus* y *Leptospira spp.* los resultados no fueron exitosos ya que solamente se obtuvieron resultados positivos con los cultivos puros (*B. abortus* y *Leptospira spp.*) y con los tejidos de hamster inoculados con *L. pomona*, pero no se pudieron observar el resto de los controles positivos de ninguno de los agentes infecciosos involucrados (Tabla 10). En base a ello se discontinuo su empleo.

#### 4.1.2.4. Bacterias oportunistas

Se aislaron en pureza diversos agentes bacterianos causantes de aborto bovino esporádico como *Arcanobacterium pyogenes* (2 casos), *Aeromona hydrophila* (1 caso), *Listeria monocytogenes* (1 caso) y *Streptococcus* alfa hemolítico (3 casos) (Tabla 4); observándose las siguientes lesiones histopatológicas: nefritis intersticial multifocal no supurativa, hepatitis multifocal leve, linfadenitis supurativa cortical (Fig. 26-a) y miositis multifocal no supurativa leve (*Arcanobacterium pyógenes*); meningitis leve no supurativa (*Aeromona hydrophila*); hepatitis multifocal necrotizante, neumonía intersticial supurativa con pleuresía, epicarditis leve moderada, miocarditis necrotizante severa no supurativa, serositis generalizada en órganos (Fig. 26- b), hemorragia multifocal en SNC (Fig. 26-c), nefritis intersticial focalizada (*Streptococcus* alfa hemolítico). En el caso de *Listeria monocytogenes* no se observaron lesiones histopatológicas pero el diagnóstico fue confirmado posteriormente por IHQ en intestino (Fig. 26-d).

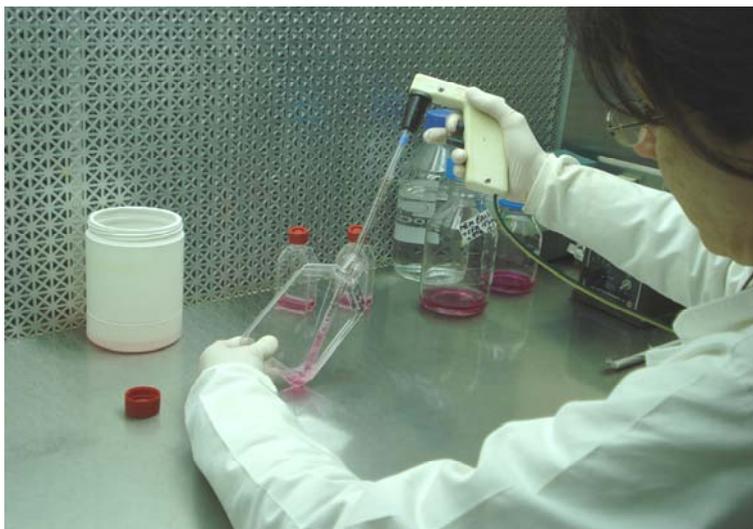


**Fig.26. Microfotografía de varios órganos de fetos bovinos abortados por bacterias oportunistas. Fig. 26(a). Linfadenitis supurativa cortical (flecha). H-E. (40X). Fig. 26(b). Serositis en linfonódulo (flecha). H-E. (10X). Fig. 26(c). Hemorragia multifocal en SNC (flechas). H-E. (10X). Fig. 26(d). Antígenos de *L. monocytogenes* en interior de criptas intestinales (flecha). IHQ. (40X).**

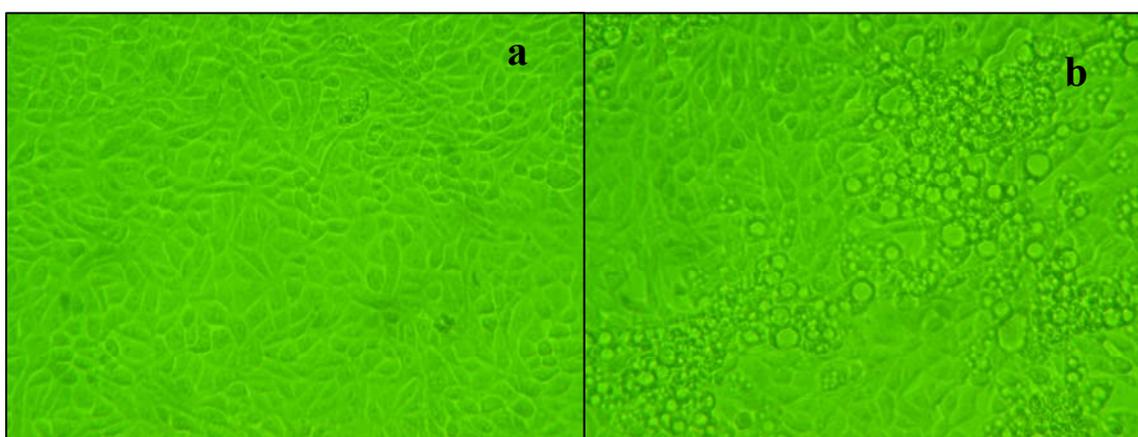
#### 4.1.3. Virus

##### 4.1.3.1. Cultivos virológicos

El cultivo virológico (Fig. 27) se realizó en 126 especímenes y fue aislado el vDVB en dos oportunidades (2/126 fetos, 1,6 %) observándose en los cultivos celulares (Fig. 28-a) el efecto citopático del virus (Fig. 28-b); mientras que el HVB no se aisló en ningún caso.



**Fig. 27.** Preparación de un cultivo celular para aislamiento viral en cámara de flujo laminar estéril.



**Fig.28(a).** Monocapa de células MDBK. **Fig. 27(b).** Efecto citopático (ECP) del vDVB en células MDBK.

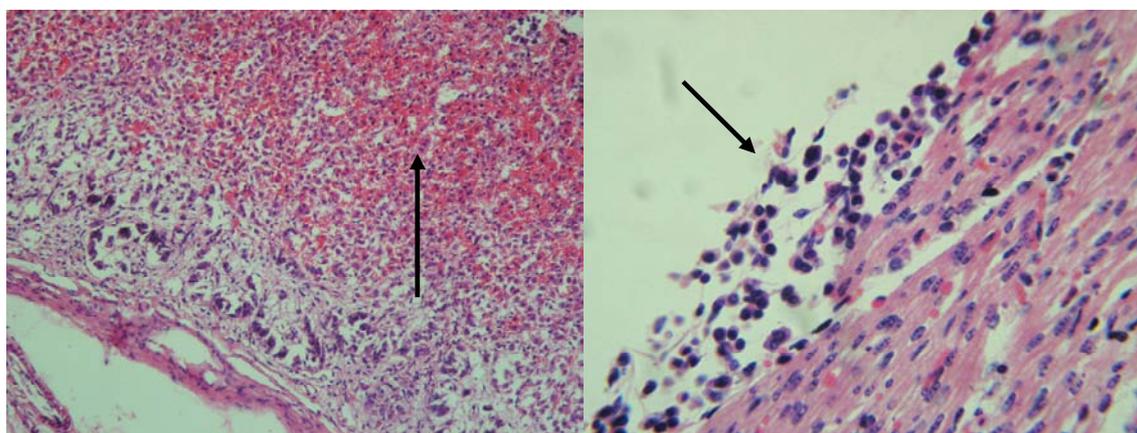
#### 4.1.3.2. Prueba de seroneutralización viral

Se analizaron 110 fluidos fetales, debido a que muchas muestras fueron descartadas por la presencia de líquido serohemorrágico que imposibilitaban la realización de la prueba por el proceso de autólisis. Se obtuvieron títulos al vDVB en 15/110 (13,6 %) y al HVB 14/110 (12,7 %) de los fluidos, respectivamente.

#### 4.1.3.3. *Diarrea viral bovina*

El vDVB fue aislado en dos oportunidades (2/126 fetos, 1.6 %) en un feto de 6 meses y en otro de 6.5 meses provenientes de un rodeo lechero y un rodeo para carne, respectivamente. En un feto no se pudo determinar la presencia de anticuerpos en los fluidos de cavidades debido al grado de autólisis y el otro feto resultó negativo con la

prueba de seroneutralización viral. En la necropsia no se encontraron lesiones aparentes, pero se observaron lesiones histopatológicas como neumonía intersticial mononuclear leve, hemorragia en corteza adrenal (Fig. 29-a), epicarditis focalizada (Fig. 29-b), hepatitis necrohemorrágica difusa, enteritis intersticial y meningitis leve no supurativa.



**Fig. 29. Microfotografía de órganos fetales de 2 fetos bovinos abortados por el vDVB. Fig. 29(a). Hemorragia en corteza adrenal (flecha). H-E. (10X). Fig. 29(b). Epicarditis focalizada (flecha). H-E. (40X).**

Los resultados del aislamiento fueron confirmados en ambos fetos por rt-PCR en muestras de fluidos de cavidad; sin embargo, las muestras de bazo de estos mismos especímenes resultaron negativas con dicha técnica. (Tabla 11). Luego de adecuar PCR, se extrajo el ARN con el kit Qiagen de 37 muestras de fluidos de cavidad fetal y 40 muestras de bazo provenientes de los fetos con diagnóstico indeterminado; y se aplicó la técnica de rt-PCR, obteniéndose resultados negativos en todos los casos (Tabla 11).

PCR	Cantidad y tipo de muestra	Métodos de extracción	Resultados
<i>VDVB</i>	2 cepas de referencia	Qiagen	- Las cepas y las muestras de LC de los 2 fetos con aislamiento fueron positivas. El B de ambos fetos dio negativo.
	37 LC y 40 B de fetos con diagnóstico indeterminado		- 37 LC y 40 B negativas.

**Tabla 11. Resultados de rt-PCR en fetos controles y fetos con diagnóstico indeterminado según muestras y métodos de extracción.**

Referencias: LC: líquido de cavidad, B: bazo.

#### 4.1.3.4. *Herpes Virus Bovino-1*

Con respecto al HVB, no se registraron aislamientos en ninguno de los 126 fetos analizados.

Los controles empleados para PCR (cepa de referencia LA 38 y cepa Van Couver) fueron adecuados y resultaron positivos a dicha técnica (Tabla 12). Luego de este paso, se realizó PCR en 40 muestras bazo de los fetos con diagnóstico indeterminado obteniéndose en todos los casos resultados negativos (Tabla 12).

PCR	Cantidad y tipo de muestra	Métodos de extracción	Resultados
<i>HVB</i>	Cepas de referencia.	Qiagen	- cepas de referencia positivas.
	40 B de fetos con diagnóstico indeterminado.		- 40 B negativos.

**Tabla 12. Resultados de PCR en fetos controles y fetos con diagnóstico indeterminado según muestras y métodos de extracción.**

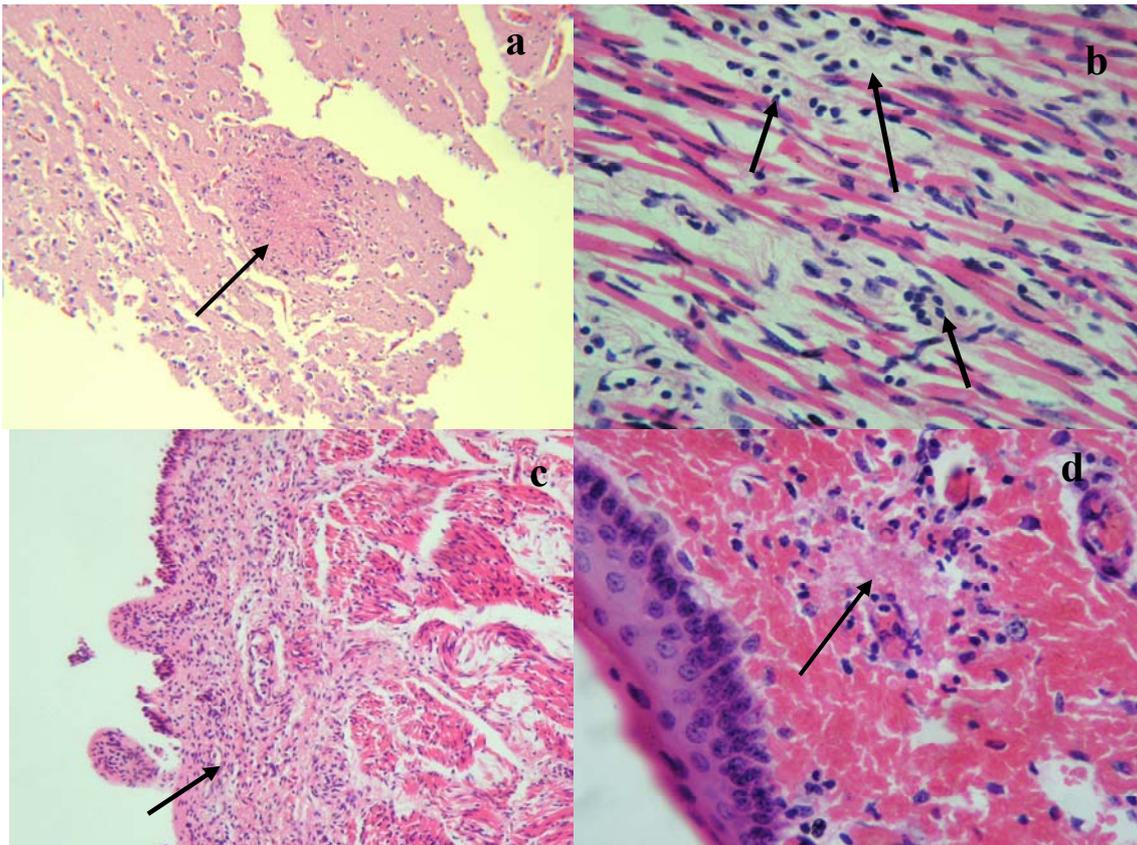
Referencias: B: bazo.

#### 4.1.4. Protozoos

##### 4.1.4.1. *Neospora caninum*

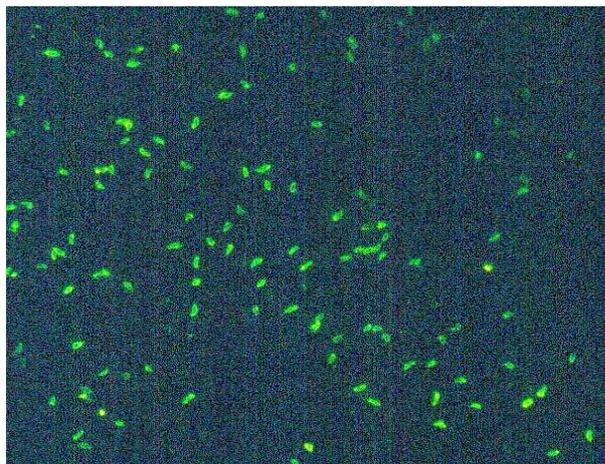
*N. caninum* fue diagnosticada en 22/150 (14,6 %) casos. La mayoría de los fetos provenían de rodeos para carne (14 fetos), pero se registraron 5 fetos de rodeos lecheros y en 3 casos no se pudo determinar el origen. El promedio de edad gestacional fue de 6 meses (con un rango de 4 a 9 meses).

En la necropsia no se observaron lesiones aparentes y ninguno de los fetos con diagnóstico a *N. caninum* estaban momificados. Los principales hallazgos histopatológicos observados fueron: encefalitis multifocal/o focalizada necrotizante no supurativa (Fig. 30-a), meningoencefalitis no supurativa, epicarditis y miocarditis intersticial no supurativa severa, miositis retroocular (Fig. 30-b), glositis intersticial no supurativa (Fig. 30-c) y glositis necrotizante focalizada (Fig. 30-d), neumonía intersticial y pleuresía no supurativa, hepatitis multifocal necrotizante y hepatitis periportal. No se observaron quistes o taquizoítos con H/E en ninguno de los fetos con lesiones histopatológicas.



**Fig. 30.** Microfotografía de varios órganos de fetos bovinos abortados por *N. Caninum*. Fig. 30(a). Encefalitis necrotizante no supurativa focalizada (flecha). H-E. (10X). Fig. 30(b). Miositis retroocular intersticial no supurativa (flechas). H.E. (40X). Fig. 30(c). Glositis intersticial no supurativa (flecha). H-E. (10X). Fig. 30(d). Glositis necrotizante focalizada. H-E. (40X).

La detección de anticuerpos por IFI se logró en 11/94 (11,7 %) fluidos fetales (Fig. 31).

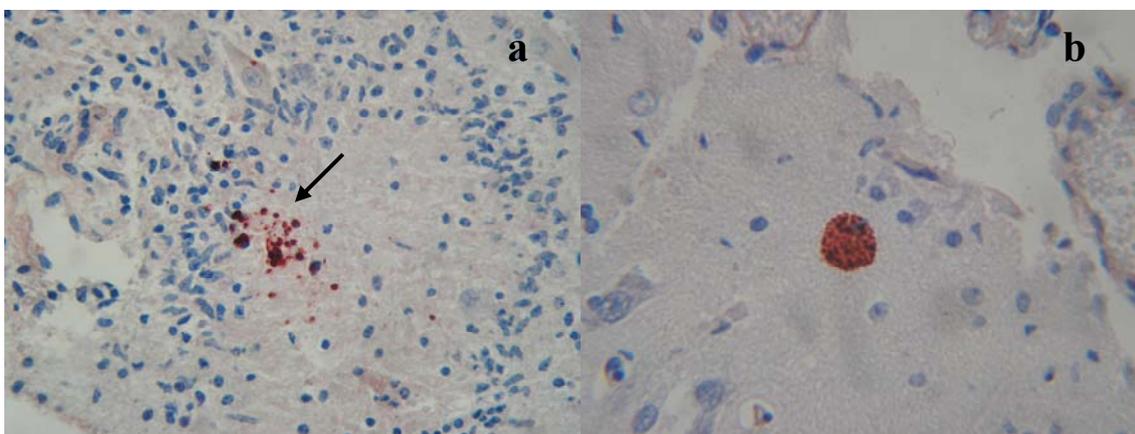


**Fig. 31.** IFI positiva a *N. caninum* en fluido de cavidad fetal. Dilución 1/25. (40X).

Se arribó al diagnóstico de *N. caninum* de la siguiente manera:

- a) 11 fetos que presentaron lesiones histopatológicas compatibles al protozoo en SNC fueron confirmados en su totalidad por IHQ (Fig. 32-a) (Fig. 32-b) (Tabla 13) y posteriormente por PCR en 6/11 fetos (debido a falta de muestra en los restantes) (Tabla 13);
- b) Se realizó PCR en otros 6 fetos que presentaron IFI positiva y en algunos casos, lesión histopatológica compatible en SNC u otros órganos, resultando todos los casos positivos a dicha técnica. En 3 de estos fetos, se realizó además PCR semianidado debido a que en la PCR común las bandas eran débiles, siendo los 3 fetos positivos (Tabla 13)
- c) Se realizó PCR sobre un total de 42 muestras de SNC de fetos con diagnóstico sin determinar, resultando 5/42 muestras positivas (Tabla 13).

En general se observó una correlación entre los resultados obtenidos entre la IHQ y PCR (8 casos) considerando la falta de muestra en 8 casos (Tabla 13). El principal órgano de elección para PCR fue SNC resultando 17 casos positivos; de los cuales en 2 oportunidades se identificó el SNC conjuntamente con el hígado y en otro caso el SNC y la placenta (Tabla 13).



**Fig. 32. Microfotografía del SNC de un feto bovino abortado por *N. caninum* . IHQ. Fig. 32(a). Taquizoítos de *N. caninum* en una lesión necrotizante en SNC (flecha). H-E. (40X). Fig. 32(b). Quiste de *N. caninum* en SNC. H-E. (40X).**

Identificación Feto N°	Tipo de rodeo	Edad Gestacional	IFI	IHQ	PCR	Lesión HP	Observaciones
04/02 <sup>(a)</sup>	s/d	4	-	+	nr	+	
04/312 <sup>(a)</sup>	carne	7.5	+	+	+(snc)	+	
04/946 <sup>(a)</sup>	leche	4	-	+	+(snc)	+	
04/315 <sup>(b)</sup>	carne	5.5	+	+	+(snc)	+	
04/657 <sup>(b)</sup>	carne	9	+	-	+(H/snc)	-	semianidado +
04/746 <sup>(b)</sup>	carne	7	+	-	+	-	
					(plac/snc)		
04/404 <sup>(c)</sup>	carne	4.5	-	-	+(snc)	-	
04/994 <sup>(b)</sup>	leche	6	+	+	+(snc)	+	semianidado +
05/238 <sup>(a)</sup>	carne	4	-	+	+(snc)	+	
05/242 <sup>(a)</sup>	leche	4	-	+	nr	+	
05/395 <sup>(a)</sup>	carne	6	+	+	+(snc)	+	
05/508 <sup>(a)</sup>	carne	8	-	+	+(snc)	+	
05/537 <sup>(a)</sup>	carne	4	-	+	nr	+	
05/631 <sup>(a)</sup>	s/d	6	-	+	nr	+	
05/651 <sup>(a)</sup>	carne	7	-	+	+(snc)	+	
05/578 <sup>(b)</sup>	carne	8	+	-	+(snc)	+	semianidado +
05/950 <sup>(b)</sup>	leche	5	+	-	+(H/snc)	+	
05/507 <sup>(c)</sup>	carne	4.5	-	nr	+(snc)	-	
05/794 <sup>(c)</sup>	carne	6	-	-	+(snc)	-	
05/705 <sup>(c)</sup>	carne	8.5	-	-	+(snc)	-	
06/182 <sup>(a)</sup>	leche	5	-	+	nr	+	
06/47 <sup>(c)</sup>	s/d	7	+	-	+(snc)	+	

**Tabla 13: IFI, IHQ y PCR para *N. caninum***

Referencias:

<sup>(a)</sup> fetos que presentaban lesiones histopatológicas compatibles con *N. caninum* en SNC y en algunos tejidos y se llegó al diagnóstico por IHQ. Posteriormente confirmada en algunos casos por PCR

<sup>(b)</sup> fetos que presentaban IFI positiva y algunos con lesión histopatológica en distintos tejidos

<sup>(c)</sup> fetos con diagnóstico indeterminado por las técnicas convencionales diagnósticas.

nr: no realizado por falta de muestra. S/D

Cuando se realizó la extracción de ADN con el método de Chelex 100 los resultados obtenidos con PCR fueron negativos tanto en el cultivo de taquizoítos (control positivo) como en las muestras de los fetos con lesión histopatológica en SNC e IHQ positiva y en los fetos con lesión HP en SNC e IFI positiva a *N. caninum* (Tabla 13). En base a estos resultados se utilizó el kit Qiagen para la extracción de ADN de las muestras de SNC de los fetos con diagnóstico indeterminado, de las cuales 5/42 resultaron positivas (Tabla 14).

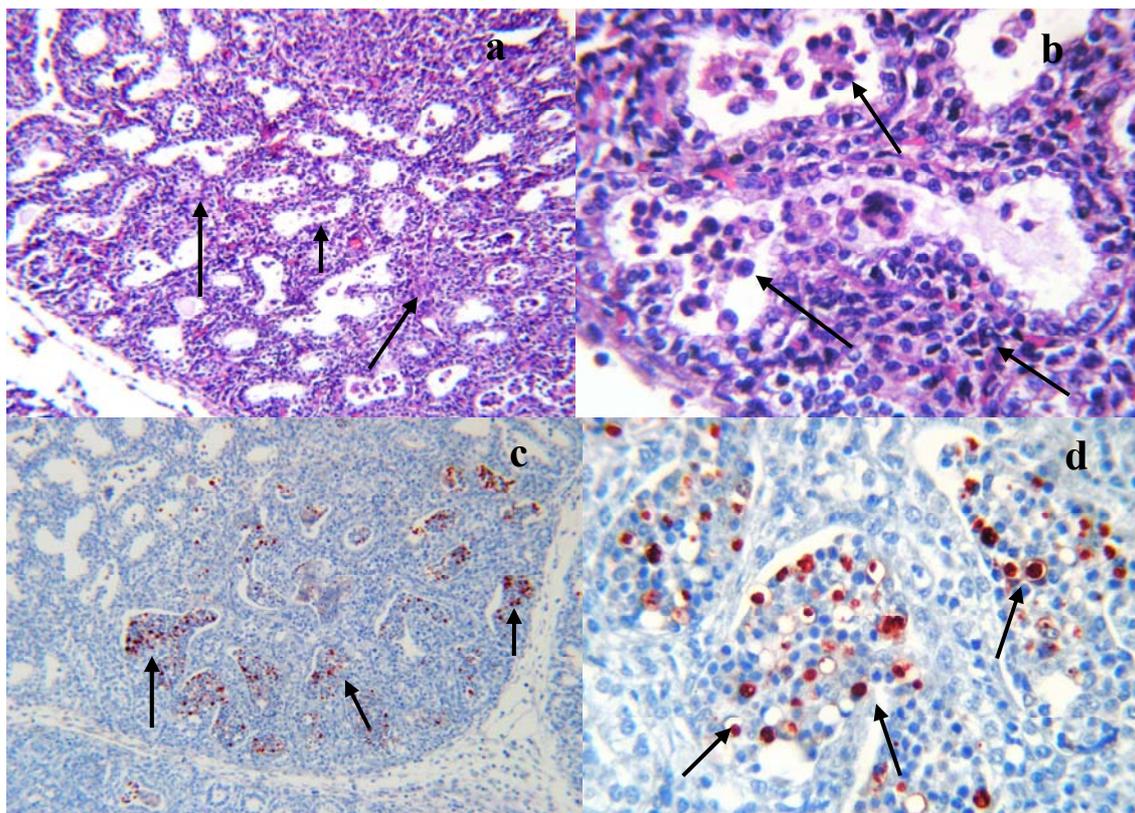
PCR	Cantidad y tipo de muestra	Métodos de extracción	Resultados
<i>N. caninum</i>	Cultivo de taquizoítos	Chelex 100	- El cultivo de taquizoítos, 6/11 fetos con lesión HP en SNC y 6/6 fetos con IFI y lesiones HP solo fueron positivos con Qiagen pero no con Chelex 100.
	11 fetos con lesión HP en SNC e IHQ +	Qiagen	
	6 fetos con IFI + y lesiones HP		
	42 SNC de fetos con diagnóstico indeterminado		- 5/42 muestras de SNC de fetos con diagnóstico indeterminado fueron positivas con Qiagen.

**Tabla 14. Resultados de PCR en fetos controles y fetos con diagnóstico indeterminado según muestras y métodos de extracción.**

Referencias: HP: histopatología, IHQ: inmunohistoquímica, IFI: inmunofluorescencia indirecta, SNC: sistema nervioso central,

#### 4.1.4.2. *Tritrichomona foetus*

*T. foetus* se aisló por cultivo en 2 fetos de 4 y 7 meses, respectivamente, procedentes de rodeos para carne. En la necropsia, pese a la severa autólisis (grado 3) se observó en un feto hepatización pulmonar; sin lesiones aparentes en el resto de los órganos. En la histología los hallazgos más importantes fueron: bronconeumonía severa no supurativa (Fig. 33-a) (Fig. 33-b) y neumonía intersticial mixta. Ambos casos fueron confirmados por IHQ siendo positivas las muestras de pulmón (Fig. 33-c) (Fig. 33-d) e intestino en cada caso, respectivamente.



**Fig. 33. Microfotografía de pulmón de un feto bovino abortado por *T. foetus*. H-E- IHQ. Fig. 33(a) - Fig. 33(b). Bronconeumonía severa no supurativa (flechas). H-E. (10X) y (40X). Fig. 33(c) - Fig. 33(d). Antígenos de *T. foetus* en interior de alvéolos y bronquiólos (flechas). IHQ. (10X) y (40X).**

La técnica de PCR resultó positiva solo cuando se empleó Qiagen para la extracción de ADN, tanto en la cepa control 339 como en las muestras (pulmón y contenido abomasal) provenientes de los 2 fetos con aislamiento positivo a *T. foetus* (Tabla 15). Sin embargo, las muestras en parafina (pulmón y abomaso) de estos mismos fetos resultaron negativas a PCR aún empleando Qiagen (Tabla 15).

PCR	Cantidad y tipo de muestra	Métodos de extracción	Resultados
<i>T. foetus</i>	Cultivo puro (cepa 339)	Qiagen	- El cultivo y las muestras de P y CA de los fetos con aislamiento fueron positivas solo con Qiagen.
	P y CA de 2 fetos con aislamiento	Proteinasa K Trizol	
	I y P en parafina de 2 fetos con aislamiento	Fenol-clororoformo-isoamílico. *1) y *2)	- Las muestras en parafina fueron negativas con todos los métodos de extracción mencionados.

**Tabla 15. Resultados de PCR en fetos con aislamiento positivo a *T. foetus* y cepas de referencia.**

Referencias: P: pulmón, CA: contenido de abomaso, \*1) Extracción de ADN de parafina, \*2) Extracción de ADN de parafina con Qiagen.

#### **4.2. CAUSAS DETERMINADAS NO INFECCIOSAS**

Malformaciones congénitas: se registraron 4 casos (3 de rodeos para carne) con fetos casi a a término (de aproximadamente 8-9 meses de edad gestacional). Se observaron lesiones macroscópicas como artrogriposis (Fig. 34-a), compresión del SNC por hidrocefalia (Fig. 34-b), desarrollo incompleto del morro (Fig. 34-c) y malformación en médula cervical (Fig. 34-d).



**Fig. 34. Malformaciones congénitas en fetos bovinos de 8 y 9 meses de edad gestacional. Fig. 34(a). Artrogriposis. Fig. 34(b). Compresión del SNC por hidrocefalia. Fig. 34(c). Desarrollo incompleto del morro. Fig. 34(d). Malformación en médula cervical.**

Origen iatrogénico: el primer caso se presentó en un lote de 320 vacas en las cuales se observaron 22 abortos (6,8 %) luego de la aplicación de un complejo polivitamínico el cual desencadenó un cuadro de shock anafiláctico con abortos y partos prematuros. En el feto remitido no se aisló ningún agente infeccioso y no se observaron lesiones histopatológicas. El otro caso se atribuyó a la aplicación de una vacuna contra el carbunco bacteridiano (*Bacillus anthracis* cepas Stern) a una vaca con gestación avanzada aislándose dicho organismo en pureza del abomaso del feto. No se aislaron otros agentes infecciosos abortigénicos, se observaron lesiones histopatológicas como miocarditis no supurativa leve y adenitis supurativa focal severa.

#### **4.3. CAUSAS INDETERMINADAS**

Los casos indeterminados fueron 73/150 (48,6 %), de los cuales 39/150 (26,0 %) presentaron lesiones histológicas sugestivas de origen infeccioso que se observaron principalmente en pulmón (neumonía intersticial no supurativa leve a moderada),

corazón (miocarditis intersticial leve y epicarditis no supurativa leve) e hígado (hepatitis multifocal no supurativa leve, hepatitis periportal no supurativa leve). En el resto de los fetos 34/150 (22,6 %) no se observaron lesiones histopatológicas, sin embargo, 4 de ellos estaban momificados (Fig. 35)



**Fig.35. Feto bovino momificado.**

No se observaron diferencias significativas ( $P>0,05$ ) entre el número de causas determinadas e indeterminadas (Tabla 4); como tampoco ( $P>0,05$ ) entre las causas indeterminadas con y sin lesiones histopatológicas (Tabla 4).

## 5. DISCUSIÓN GENERAL

Diversos estudios han demostrado que se llega a un diagnóstico de la causa del aborto bovino en el 30 al 50 % de los casos (Kirk, 2003; Campero et al., 2003, Campero, 2006, Anderson, 2007), siendo las principales limitantes de la sensibilidad el grado de autólisis de los especímenes y la contaminación fetal (Kirkbride, 1985, 1986). En el presente estudio el 61 % de los fetos presentó autólisis moderada (grado 2) o severa (grado 3), observándose en ciertos casos que el estado de conservación del material abortado comprometió la eficiencia de algunas de las técnicas diagnósticas utilizadas.

A pesar de los factores mencionados, las causas del aborto bovino se identificaron en el 50 % de los fetos, siendo este resultado similar a lo obtenido por otros autores (Anderson et al., 1991, Campero et al., 2003, Corbellini et al., 2006, Givens, 2006). Las causas indeterminadas correspondieron al 50 % restante, de las cuales el 27,3 % presentaron lesiones histopatológicas sugiriendo la intervención de un agente infeccioso como causa del aborto (Anderson et al., 1990, Campero et al., 2003).

Las causas de origen infeccioso siguen siendo las principales responsables en la etiología del aborto bovino (Anderson et al., 1990, Kirkbride, 1993, Jamaluddin et al., 1996, Campero et al., 2003) y en el presente estudio *N. caninum* fue el microorganismo identificado con mayor frecuencia (Morrell, datos sin publicar).

Las edades gestacionales de la mayoría de los fetos analizados correspondieron al último tercio de la gestación, tanto para explotaciones del ganado para carne o leche. En los rodeos para carne, este hecho podría explicarse por las condiciones extensivas de manejo, lo cual dificulta la identificación de los fetos abortados más pequeños, que generalmente no se detectan por su tamaño o por acción de los depredadores naturales (Evermann et al., 1982, Thurmond et al., 1994, Jamaluddin et al., 1996, Campero et al., 2003). Por otro lado, el número de fetos provenientes de rodeos lecheros fue menor. Una de las causas de ello podría deberse a que la zona de influencia del INTA Balcarce donde se realizó este trabajo es predominantemente de cría, siendo la cuenca lechera de Mar y Sierra limitada en el número de explotaciones.

Las condiciones de manejo vinculados a la producción de leche, causas de estrés e inadecuada nutrición, pueden afectar la eficiencia reproductiva de la vaca lechera haciendola más vulnerable a los agentes infecciosos que en el ganado para carne. Las pérdidas reproductivas registradas en los distintos tipos de establecimientos, debido a

variaciones en el manejo, nutrición y en la dificultad para observar el material abortado han sido mencionadas en trabajos previos (Carpenter et al., 2006, Gadické and Monti, 2008).

La identificación en el laboratorio de los agentes infecciosos involucrados en el aborto bovino se realiza mediante el empleo conjunto de técnicas convencionales de diagnóstico como aislamiento, histopatología, inmunohistoquímica y serología. (Campero et al., 2003, VanMaanen et al., 2004, Corbellini et al., 2006, Reitt et al., 2007). Sin embargo, en los últimos años, el advenimiento de nuevas técnicas moleculares como PCR han permitido optimizar el diagnóstico del aborto bovino (Richtzenhain et al., 2002, da Silva et al., 2009). La prueba de PCR es rápida, reproducible, altamente sensible y específica (Batt, 1997, Wei.Tang et al., 1997) pero el éxito de la misma depende de varios factores (primers utilizados, temperatura del termociclador durante el proceso de amplificación, estado y conservación de la muestra, método de extracción para obtener el ADN puro, etc), los cuales deben ser controlados (Hoofar et al., 2004, Conraths and Schares, 2006) y estandarizados para cada uno de los microorganismos involucrados en el aborto bovino a detectar.

En el presente estudio, con el auxilio e implementación de la técnica de PCR se diagnosticaron 15 casos de aborto que inicialmente se habían clasificado como indeterminados por los métodos convencionales. Por lo tanto, los resultados obtenidos con PCR permitieron por un lado incrementar el diagnóstico etiológico en un 10 % y por otro lado confirmar las hipótesis postuladas en el presente estudio.

El síndrome del aborto bovino es un problema de rodeo, por lo tanto para incrementar la sensibilidad del diagnóstico se debería realizar una investigación epidemiológica, siendo fundamental los datos aportados por el veterinario clínico (Gadicke and Monti, 2008). Con respecto a este punto, en el presente estudio se obtuvieron antecedentes en el 73 % de los casos remitidos, pero la calidad de la información suministrada fue pobre e insuficiente ya que no abarcaban a los todos los posibles factores de riesgo relacionados con la población de la cual provenían.

## 5.1. Bacterias

### 5.1.1. *Brucella abortus*

La prueba clásica que permite confirmar el diagnóstico de la enfermedad es el aislamiento del agente infeccioso y la posterior caracterización bacteriológica (Alton et al., 1975) a partir de órganos y fluidos fetales y maternos. Se han utilizado distintos

medios selectivos para el cultivo (Garin-Bastuji et al., 2006, Her et al., 2010) que aumentan la sensibilidad; sin embargo, esta técnica insume tiempo, se requieren laboratorios con niveles de bioseguridad adecuados para evitar riesgos para el personal del laboratorio y no permite diferenciar entre las distintas especies de *Brucella* (Nielsen and Duncan, 1990, Leyla et al., 2003, Seleem et al., 2010). La baja sensibilidad del aislamiento depende de factores tales como las técnicas individuales de laboratorio, cantidad de organismos en la muestra, estadio de la infección y métodos utilizados para el cultivo (Seleem et al., 2010). En el presente estudio, *B. abortus* se diagnosticó mediante cultivo en 6/129 (4,6 %) de los fetos y posteriormente por PCR, en 4 fetos que habían sido previamente negativos al cultivo y tenían diagnóstico indeterminado. Estos resultados y registros previos de abortos bovinos por *B. abortus* en Argentina (Campero et al., 2003, Costa et al., 2004, Draghi et al., 2006, Di Paolo et al., 2007, Fernández et al., 2007, Campero et al., 2010) confirman la vigencia de la enfermedad en los rodeos bovinos de nuestro país. El lugar primario de invasión y multiplicación de *B. abortus* son las células trofoblásticas de la placenta, hecho que ha sido comprobado mediante la técnica de IHQ (Anderson et al., 1986). Desafortunadamente, en el presente estudio no se disponía de tejido placentario en la mayoría de los casos. Mediante IHQ realizada en el intestino y pulmón de los 6 fetos con cultivos positivos a *B. abortus* se pudo confirmar el diagnóstico en 4/6 oportunidades. Si bien la IHQ es una excelente técnica de diagnóstico complementaria al cultivo de la bacteria (Pérez et al., 1998, Xavier et al., 2009), los resultados obtenidos en el presente estudio demostraron que la sensibilidad de la misma fue menor que la del cultivo.

Los cambios histológicos más prominentes en los fetos infectados por *B. abortus* se observan en el pulmón (López et al., 1984, López et al., 1989, Hong et al., 1991, Jubb et al., 2007), siendo la neumonía intersticial y la bronconeumonía las lesiones más características. En este estudio además de estar presentes las lesiones pulmonares mencionadas, se hallaron fetos con meningitis no supurativa, pericarditis y miocarditis no supurativas y peritonitis no supurativa, coincidiendo con otros trabajos (Hong et al., 1991, Xavier et al., 2009); sin embargo, no se registraron lesiones de pleuritis fibrinosa como mencionan otros autores (Palmer et al., 1996, Pérez et al 1998). En la presente tesis se observó hepatitis multifocal necrotizante en dos oportunidades; ello podría relacionarse con los hallazgos de Meador et al. (1988), quienes trabajando con cabras infectadas con *B. abortus* hallaron lesiones leves de hepatitis periportal.

La técnica de PCR se ha utilizado en forma efectiva para diferenciar los distintos géneros y especies de *Brucella* (Baily et al., 1992, Bricker and Halling 1994, Romero et al., 1995, Mayer-Scholl et al., 2010) y para el diagnóstico de los casos clínicos a partir de muestras de origen animal (Fekete et al., 1992, Leal-Klevezas et al., 1995b, Gallien et al., 1998, Cetinkaya et al., 1999, Leal-Klevezas et al., 2000, Cortez et al., 2001, Richtzenhain et al., 2002, Leyla et al., 2003, Garin-Bastuji et al., 2006, Leary et al., 2006).

Una de las dificultades más comunes que pueden interferir con el éxito de PCR es la presencia de sustancias inhibidoras en las muestras y el exceso de ADN proveniente del tejido del hospedador (Bricker, 2002). Cada tipo de muestra requiere una adecuada preparación y de ello depende el método de extracción utilizado (Bricker, 2002, Newton, 1985). Con respecto a este punto, Richtzenhain et al. (2002) obtuvieron mejores resultados para extraer el ADN de un pool de tejidos fetales y de contenido abomasal con la ebullición que con el método enzimático (proteinasas K) sugiriendo una probable remoción de las sustancias inhibidoras en las muestras por el efecto del calor. En el presente estudio, la técnica de PCR fue exitosa solo cuando se empleó para la extracción del ADN el kit Qiagen procesando muestras de pulmón. En algunos trabajos como el de Fekete et al. (1992) y el de Cetinkaya et al. (1999) determinaron una sensibilidad del 98 % y 80 % con PCR utilizando muestras de tejidos fetales bovinos y de contenido abomasal, en cada caso, respectivamente. En el presente trabajo, la técnica de PCR fue más sensible que el cultivo e IHQ en las muestras de tejido pulmonar fetal, permitiendo identificar 4 fetos con diagnóstico indeterminado. Si bien este resultado no fue tan alentador como se describe en otros trabajos (Fekete et al., 1992, Gallien et al., 1998, Cetinkaya et al., 1999, Cortez et al., 2001, da Silva et al., 2009), la elevada sensibilidad, especificidad y practicidad que ofrece esta técnica molecular sugieren la incorporación de la misma en la rutina diagnóstica del aborto bovino.

### 5.1.2. *Campylobacter fetus*

Los procedimientos más utilizados para el diagnóstico de la campylobacteriosis son el aislamiento y la IFD (Kulkarni et al., 2002, van Bergen et al., 2005) a partir de muestras prepuciales, MCV y muestras fetales (Cipolla et al., 1995a; Campero, 2000; Cobo et al., 2003). Coincidentemente con los resultados mencionados por Fernández et al. (2007), *C. fetus* fue la bacteria que se diagnosticó con mayor frecuencia (14 fetos), observándose una elevada correlación entre IFD y PCR. En coincidencia con lo

reportado por Ferreira Figueiredo et al. (2002), la IFD resultó ser una técnica sensible y específica.

En la necropsia se observó en uno de los fetos que el hígado presentaba nodulaciones en la superficie y estaba aumentado de tamaño, siendo este hallazgo poco frecuente en los fetos abortados por *C. fetus spp.* (Kennedy and Palmer, 1992)

Mediante la IHQ, Campero et al. (2005) demostraron que la misma puede detectar *C. fetus spp.* en los casos naturales de aborto bovino y ovino, siendo una herramienta de valor, lo cual coincide con otros autores (Dagleish et al., 2010, Ramos-Vara et al., 2002<sup>a</sup> 2002<sup>b</sup>) y de suma utilidad cuando los tejidos fetales presentan avanzada autólisis que afecta el aislamiento mediante cultivo. Además la IHQ permite observar la distribución del antígeno en asociación con las lesiones microscópicas (Haines and Chelack, 1991, Eyzaguirre et al., 2008). En el presente estudio se detectaron por IHQ 13/14 fetos positivos a *C. fetus spp* por cultivo e IFD; siendo además la sensibilidad de ésta técnica mayor que la de PCR.

La clasificación fenotípica de *C. fetus spp.* se basa en su tolerancia a la glicina al 1 %, lo cual permite diferenciar a *C. fetus* subsp. *fetus* (tolerante) de *C. fetus* subsp. *venerealis* (no tolerante) (Chang and Ogg, 1971). Sin embargo, existen variantes de tolerancia a la glicina cuando se trata de *C. fetus* subsp. *venerealis* (biovar *intermedius*) (On et al., 1996; Wagenaar, personal communication). Existe controversia sobre los métodos fenotípicos empleados para discriminar las subespecies de *C. fetus* (Hum et al., 1997). En coincidencia con otros autores (Hum et al., 1997; Wagenaar et al., 2001; Schulze et al., 2006), la técnica de PCR permitió discriminar entre las subespecies de *C. fetus*. A diferencia de Anderson (2007), quien menciona a *C. venerealis* como la subespecie más importante asociada a los casos de aborto, en el presente estudio *C. fetus fetus* fue el único agente aislado. Por otro lado, cuando se procesaron las muestras de los 14 fetos, previamente positivas por cultivo e IFD, se obtuvo mayor sensibilidad en las muestras de contenido abomasal (12/14) que en las de pulmón fetal (6/12) sugiriendo la presencia de inhibidores en este tipo de muestras (Rossen et al., 1992; Wilson, 1997; Al-Soud and Radstrom, 2000) o bien un mayor número de bacterias. Finalmente, el éxito de la técnica de PCR depende de numerosas variables, siendo una de ellas el método de extracción utilizado (Newton, 1985). En el presente estudio, este hecho quedó demostrado cuando se utilizó isopropanol como método de extracción; ya que las muestras de los fetos controles (positivos por cultivo e IFD) y la cepa de

referencia resultaron negativas a PCR mientras que cuando la extracción de las mismas se realizó con el kit Qiagen (3.9) los resultados de PCR fueron positivos.

La técnica de lectinohistoquímica permite estudiar el patrón de glucoconjugados en los tejidos (Sharon and Lis, 1989; Spicer and Schulte, 1992; Ambrosi et al., 2005). *C. fetus* puede cruzar la placenta causando placentitis e hipoxia fetal. En este estadio, el feto puede inhalar el líquido amniótico infectado con *C. fetus* o deglutirlo llegando de esta manera a los pulmones o tracto gastrointestinal (Miller et al., 1982), dando origen a posibles modificaciones en los glucoconjugados epiteliales de estos tejidos. Pese a que la lectinohistoquímica fue de utilidad para detectar alteraciones en tejidos fetales experimentalmente infectados con *C. fetus spp.* (Cipolla et al., 1998) en el presente estudio los cambios observados en los glucoconjugados del intestino y pulmón fetal no fueron relevantes, sugiriendo una gran variabilidad en los epitelios que depende de la especie, (Barkhordari et al., 2004), de la edad (Falk et al., 1994) y del tejido involucrado.

Se concluye que la IFD es una técnica rápida, sensible y se emplea de rutina para el diagnóstico de la campylobacteriosis en la mayoría de los laboratorios de diagnóstico veterinario del país. Sin embargo, dicha técnica no permite discriminar entre las subespecies de *C. fetus*, a diferencia de PCR, que cuenta con esta ventaja (Vargas et al., 2003). Finalmente, para optimizar la técnica de PCR para el diagnóstico del aborto bovino por *C. fetus spp.* se sugiere utilizar el kit Qiagen (3.9) para la extracción del ADN y preferentemente muestras de contenido abomasal.

### 5.1.3. *Leptospira spp.*

Existen varias técnicas de diagnóstico para identificar *Leptospira spp.* en tejidos bovinos (Smith et al., 1994). Si bien el cultivo de la bacteria es un método que sigue vigente, el mismo es lento, laborioso y requiere de personal capacitado para su realización (Smith et al., 1994). Con la técnica de IHQ para *Leptospira spp.* se obtuvieron mejores resultados que con la tinción argéntica de Warthin Starry e IFD cuando se realizó en bovinos adultos (Yener and Keles, 2001). Sin embargo, existe escasa información sobre el empleo de la misma para el diagnóstico de leptospirosis en tejidos fetales bovinos (Morrell et al., 2006). Las lesiones histopatológicas compatibles con leptospirosis, como nefritis y hepatitis intersticial no supurativa, observadas en el presente estudio fueron coincidentes con las descritas en trabajos previos (Yener and Keles, 2001).

En el presente estudio se observó que la técnica de IFD resultó más sensible que la IHQ, la tinción argéntica de Warthin Starry y PCR; esta última, es altamente sensible y específica (Wagenaar et al., 2000, Jouglard et al., 2006, Djadid et al., 2009).

La técnica de PCR para *Leptospira spp* se desarrolló en base al trabajo de Mérien et al. (1992) quienes a diferencia de este estudio, trabajaron con tejidos frescos. Este factor podría ser una de las causas del fracaso de PCR al utilizar tejidos fetales autolíticos, fijados con formol y parafinados. Si bien la mayoría de los fetos positivos a *Leptospira spp* por IFD en este trabajo presentaron lesiones histopatológicas compatibles con dicho agente, no habría que descartar la existencia de resultados falsos positivos obtenidos por IFD. Este hecho se ha mencionado como una de las limitantes de la IFD especialmente cuando son pocos los microorganismos presentes en los tejidos (WHO, 2003).

Richtzenhain et al. (2002) desarrollaron una PCR multiplex para detectar *B. abortus* y *Leptospira spp* en tejidos de fetos bovinos y en un grupo de hamsters inoculados con *L. pomona*, obteniendo una sensibilidad del 100 %. Pese a que en el referido trabajo se emplearon las mismas condiciones que en el presente estudio; la mayoría de las muestras del presente estudio (a excepción de los cultivos puros y de los tejidos de hamsters inoculados experimentalmente con *L. pomona*) resultaron negativas (Tabla 10). Esta circunstancia podría deberse a que si bien con PCR multiplex se puede detectar más de un organismo en una misma reacción, el éxito de la misma depende de varios factores como el diseño cuidadoso de los primers ya que deben poseer temperaturas de annealing similares para este tipo de reacción (Wei-Tang et al., 1997). Dichos factores, sumado a variables propias de la PCR común, podrían haber influenciado el resultado final (Schoder et al., 2003). Otra posible explicación es el severo grado de autólisis fetal de las muestras evaluadas ya que solamente los cultivos puros y las muestras provenientes de los hamsters inoculados experimentalmente con *L. pomona* fueron las únicas positivas.

Como se mencionó anteriormente, los casos de leptospirosis diagnosticados en este estudio resultaron de la aplicación de la IFD (Tabla 9). En general, los órganos de rutina que se utilizaron para ésta técnica fueron hígado, riñón y humor acuoso. Si bien se ha reportado que en los casos de autólisis fetal, las leptospiras se preservan mejor en el humor acuoso (Smith et al., 1994), en nuestro caso, el diagnóstico por IFD en este tipo de muestra y en las improntas de hígado, resultó difícil debido a la presencia de

artefactos de fondo que dificultaban la observación microscópica. La mayoría de los casos positivos a *Leptospira spp.* en la IFD se observaron en el tejido renal (Tabla 9) lo cual sugiere que éste órgano sería el de elección para IFD.

La mayoría de los trabajos en los cuales se ha empleado la IHQ para la identificación de leptospiras, se han realizado con éxito en tejidos frescos de animales adultos sacrificados (Ellis et al., 1983; Scanziani, 1991; Yener and Keles, 2001, Delgado et al., 2007), siendo escasos los trabajos en fetos bovinos. Pese a que la IHQ es un método de diagnóstico específico y permite visualizar simultáneamente el agente infeccioso y la lesión en los tejidos (Scanziani, 1991; Cartun et al., 1995), en el presente estudio, los resultados con ésta técnica no fueron satisfactorios. En algunos casos se pudieron observar 1 ó 2 leptospiras/10 campos microscópicos observados cuando se utilizaron los protocolos N° 3 y N° 4 (Tabla 1), circunstancia probablemente influenciada por el mayor tiempo de incubación al cual estuvo expuesto el anticuerpo primario (Tabla 1). La autólisis fetal y los efectos del formol son los principales factores que perjudican la integridad de los antígenos en los tejidos (Ellis et al., 1982; Beckstead, 1994). Los tratamientos de recuperación antigénica también pueden ser perjudiciales (Kanai et al., 1998; White et al., 1998) para la integridad del microorganismo. A pesar de haber realizado el bloqueo de la enzima peroxidasa endógena y de aumentar las diluciones del anticuerpo primario y secundario (Haines and Chelack, 1991) (Tabla 1), el principal inconveniente observado en la IHQ fue la persistencia de artefactos de fondo en los tejidos y la baja sensibilidad para detectar los antígenos tisulares.

Se concluye que la IFD es una herramienta de utilidad para la rutina diagnóstica del aborto bovino, aunque se debe ser cauteloso en la observación microscópica para evitar resultados falsos positivos. La utilización de otros protocolos de tratamiento antigénico e incubaciones prolongadas para IHQ y mejoras en la PCR permitirán detectar leptospiras en los fetos abortados espontáneamente. El factor de autólisis tisular actuó en detrimento de la sensibilidad de las técnicas empleadas en el presente trabajo.

#### 5.1.4. Bacterias oportunistas

Coincidentemente con otros trabajos (Anderson et al., 1990, Jammaludin et al., 1996, Campero et al., 2003, Reitt et al., 2007) *A. pyogenes* fue la bacteria oportunista diagnosticada con mayor frecuencia. La ausencia de *Salmonella sp.* sugiere que la implicancia de esta bacteria en los casos de abortos bovinos espontáneos en nuestro país

es relativa como ya fue mencionado (Campero et al., 1994, Campero et al., 2003, Campero et al., 2010).

Finalmente, las bacterias oportunistas incluídas en el diagnóstico final del presente estudio presentaron lesiones histopatológicas. Si bien la presencia de estos organismos patógenos oportunistas en el feto y/o placenta no son determinantes como causa de aborto en el bovino, su asociación con lesiones histopatológicas le da relevancia diagnóstica, aunque usualmente se trata de casos individuales (Agerholm et al., 1997, Campero et al., 2003).

## 5.2. Virus

### 5.2.1. *Diarrea Viral Bovina*

El diagnóstico del vDVB es esencial para el adecuado desarrollo de medidas preventivas y de control de la enfermedad en el rodeo (Brock, 1995). Existen diferentes pruebas para detectar el vDVB en los animales PI (Cornish et al., 2005, Kennedy et al., 2006, Driskell and Ridpath, 2006, Edmondson et al., 2007) como IHQ, ELISA de captura de antígeno, aislamiento viral y rt-PCR siendo esta última una herramienta diagnóstica sensible y rápida (Muñoz-Zanzi et al., 2000, Weinstock et al., 2001, Kennedy et al., 2006, Smith et al., 2008).

En el presente estudio, el aislamiento del vDVB se logró en dos fetos, algunas lesiones histopatológicas halladas en pulmón y corazón, coincidieron con las mencionadas por Murray (1991). Las lesiones en pulmón explicarían en parte la patogenia del aborto (Swasdipan et al., 2002). Por otro lado, se obtuvieron títulos positivos al vDVB en 15/110 (13,6 %) fluidos fetales analizados siendo este porcentaje mayor que el obtenido por Yapkić et al. (2006) quienes encontraron 1/64 (1,5 %) fluidos fetales positivos. Los 15 fluidos fetales en los cuales se detectaron anticuerpos al vDVB, pertenecían a fetos mayores a los 120 días de gestación, lo cual demuestra la inmunocompetencia fetal en dicha edad (Larson, 1996).

Con la técnica de rt-PCR utilizada en el presente trabajo (Ridpath et al., 1994) resultaron positivas al vDVB las muestras de fluido de cavidad de los 2 fetos con aislamiento previo a este virus; sin embargo, las muestras de bazo de estos mismos fetos resultaron negativas al vDVB. Es factible que este resultado pudo estar influenciado por la presencia de ciertas sustancias inhibitoras (Rossen et al., 1992), o RNAsas (Hale et al., 1996) en el tejido esplénico. Cuando se realizó rt-PCR en 37 fluidos fetales

provenientes de fetos con diagnóstico indeterminado (5 de los fluidos fetales tenían anticuerpos contra el vDVB), los resultados fueron negativos en todos los casos. Este hallazgo difiere con lo obtenido por Hyndman et al. (1998) quienes hallaron con rt-PCR 8/100 (8 %) fluidos fetales positivos al vDVB de los cuales 5/8 fluidos fetales presentaban anticuerpos específicos del vDVB. Ello permite sugerir la importancia de la serología fetal como técnica complementaria para el diagnóstico del aborto bovino. Se concluye que si bien en el presente estudio el porcentaje de abortos por el vDVB fue bajo (1,3 %) en comparación con otros trabajos (Muñoz et al., 1996, Campero et al., 2003), la infección por el vDVB es un hallazgo frecuente en los rodeos de nuestro país. Por otro lado, los resultados negativos obtenidos en el presente estudio con la prueba de rt-PCR realizada a partir de los fluidos de los fetos con diagnóstico indeterminado no implicaron resultados falsos negativos. Finalmente, otra de las ventajas del rt-PCR es que permite detectar el RNA del vDVB en muestras que podrían ser tóxicas para las células del cultivo utilizadas en el aislamiento viral.

### 5.2.2. *Herpes Virus Bovino-1*

El aislamiento viral es considerado la prueba “estandar de oro” para la detección del HVB-1, con las desventajas del tiempo que lleva este procedimiento y que se requiere un número suficiente de partículas virales para arribar a un resultado final (Takiuchi et al., 2005). En el presente estudio no se registraron aislamientos del HVB-1 en ninguno de los 126 fetos analizados, probablemente por el proceso de autólisis de las muestras analizadas (Kirkbride, 1992) y/o por la presencia de enzimas presentes en los tejidos, las cuales son tóxicas para las células del cultivo (Avila Sánchez et al., 2008, Moore et al., 2000). Adicionalmente, algunos tejidos pueden contener inhibidores virales que interfieren con el aislamiento (Moore et al., 2000) por lo que no se descarta la presencia de ellos en los tejidos fetales procesados en este estudio.

Otros métodos alternativos utilizados para identificar en forma directa el antígeno del HVB-1 en los tejidos son las técnicas de IFD e IHQ (Ogino et al., 1996), las cuales son más rápidas que el aislamiento viral pero menos sensibles (Delgado et al., 1992). Desafortunadamente, en el presente estudio dichas técnicas no se aplicaron en la rutina diagnóstica.

Se han desarrollado varios PCR para la detección de HVB-1 a partir de muestras de semen (Van Engelenburg et al, 1995), exudado nasal (Moore et al., 2000, Alegre et al., 2001), ganglio sensorial infectado latentemente (Van Engelenburg et al., 1993).

Varios autores hacen referencia al PCR como de importancia para el diagnóstico del aborto por HVB-1 debido a su practicidad, sensibilidad y rapidez (Rocha et al., 1998, Takiuchi et al., 2005, Brower et al., 2008). En el trabajo de Takiuchi et al. (2005) de un total de 55 fetos, 14/55 (25,4 %) fetos resultaron positivos al HVB-1 con PCR y de 5/55 fetos (9.1 %) se obtuvo el aislamiento viral. En el presente estudio, pese a que el PCR realizado con las cepas de referencia de HVB-1 fueron positivas con PCR y se utilizó un protocolo similar al de Takiuchi et al. (2005), al procesar las muestras de bazo de los fetos con diagnóstico indeterminado, los resultados obtenidos fueron negativos.

### 5.3. Protozoos

#### 5.3.1. *Neospora caninum*

Trabajos recientes han demostrado que *N. caninum* es el principal agente infeccioso involucrado en el aborto bovino (Kim et al., 2002, Corbellini et al., 2006, Reitt et al., 2007), siendo variables los porcentajes de aborto asociados al protozoo: 34,1 %, n=242 (Sager et al., 2001), 21,1 %, n=180 (Kim et al., 2002), 31,3 %, n=80 (Pereira-Bueno et al., 2003), 24,8 %, n=105 (Cabral et al., 2009). En el presente estudio, *N. caninum* fue el agente infeccioso identificado con mayor frecuencia (16 % n=150). Los abortos por *N. caninum* pueden ocurrir desde los 3 meses hasta el 8° mes, siendo lo más frecuente las pérdidas en la mitad de la gestación (Anderson et al., 2000, Cabral et al., 2009), como también se observó en el presente trabajo. Ocasionalmente se reportan además pérdidas neonatales (Dubey and Schares, 2006). Otra característica de ésta enfermedad es la presencia de fetos momificados (Moennig and Liess, 1995); si bien en el presente estudio se registraron 4 momias, en ningún caso se confirmó la infección por *N. caninum* en dichos hallazgos.

*N. caninum* produce lesiones inflamatorias caracterizadas por infiltrados de células mononucleares en el miocardio, músculo estriado o hígado, siendo la encefalitis multifocal necrotizante la lesión más característica (Dubey, 2003, Pescador et al., 2007). En el presente estudio se utilizó la histopatología para discriminar los posibles casos de aborto por *N. caninum* en base a las lesiones observadas en sistema nervioso, detectándose 11 casos positivos los cuales posteriormente fueron todos confirmados por IHQ y en 6 casos por PCR. En los casos restantes no se pudo realizar PCR por falta de muestras. Si bien la histopatología permite observar las lesiones “*in situ*” producidas por *N. caninum*, se debe considerar la existencia de los fetos infectados con el protozoo

en los que no se observan estas lesiones como ocurrió en 6 fetos del presente trabajo (Tabla 13). La baja sensibilidad de la histopatología para detectar quistes o taquizoítos con la tinción de hematoxilina-eosina (Dubey et al., 1998), sumado a lo expuesto previamente, sugieren que se le deben adicionar otras técnicas más sensibles y específicas como IHQ y PCR.

Diferentes autores pudieron confirmar por IHQ la elevada correlación existente entre la observación de encefalitis multifocal y la presencia del protozoo (Campero et al., 1989, Anderson et al., 1991, Wouda et al., 1997, Sager et al., 2001, Corbellini et al., 2002), similar hallazgo se obtuvo en el presente trabajo. Algunos autores han mencionado resultados falsos positivos a IHQ (Reitt et al., 2007), o reacciones cruzadas con otros protozoos relacionados como *T. gondii* y *Sarcocystis spp.* (Van Maanen et al., 2004). Dichos agentes infecciosos raramente provocan abortos en el bovino (Canada et al., 2002b) y los antisueros primarios utilizados resultan negativos a estos agentes (Campero et al., 1989). Moore et al. (2008) diagnosticaron más casos de aborto a *N. caninum* con la técnica de IHQ que con PCR, mientras que otros autores (Gottstein et al., 1998, Conraths and Shares, 1999, Dubey, 1999, Reitt et al., 2007) coinciden en mencionar la baja sensibilidad de la IHQ para detectar *N. caninum* en tejidos fetales. Es factible que el formol utilizado para conservar las muestras (Boenisch, 2005), sumado al proceso de autólisis fetal, afecte a la sensibilidad de la técnica (Moore et al., 2005). En coincidencia con otro trabajo (Sager et al., 2001), el presente estudio, la IHQ resultó menos sensible que PCR (Tabla13).

La presencia de anticuerpos de *N. caninum* en los fluidos fetales es indicativa de exposición fetal transplacentaria (De Meerschman et al., 2002). Diversos trabajos han demostrado baja sensibilidad de la IFI en los fluidos fetales (Barr et al., 1995, Sôndgen et al., 2001, Alvarez-García et al., 2003) probablemente por la inmunotolerancia o inmadurez inmunológica en los fetos en los estadios iniciales de la gestación, por la degradación de las inmunoglobulinas debido a la autólisis (Wouda et al., 1997a, Ortega. Mora et al., 2006), o por la muerte fetal en la fase aguda de la infección (Gottstein et al., 1998). Pese a que la presencia de anticuerpos en los fluidos fetales no es concluyente para diagnosticar el aborto; en este estudio 6/11 fetos con IFI positiva a *N. caninum* resultaron positivos con PCR en SNC (Tabla 13).

A diferencia de la IHQ, la técnica de PCR permite detectar pequeñas cantidades de ADN en los tejidos fetales autolíticos y en fetos momificados (Cabral et al., 2009). Es factible que el ADN resulte más resistente que las proteínas al proceso de lisis

celular (Reitt et al., 2007). Sin embargo, en el trabajo de Kim et al. (2002) existieron discrepancias con respecto a los resultados obtenidos con PCR cuando las lesiones inflamatorias en SNC eran leves. Baszler et al. (1999) sugieren que estos resultados probablemente estén influenciados por la distribución focalizada del parásito y diferencias en el muestreo (tamaño y número de muestras) sugiriendo el empleo de al menos 20 mg de tejido fetal para asegurar una cantidad suficiente de taquizoítos de *N. caninum*. Collantes-Fernández et al. (2005) observaron que la mayoría de los tejidos eran positivos a PCR cuando los fetos pertenecían al primer y segundo trimestre de la gestación mientras que los fetos abortados en el tercer trimestre gestacional, el parásito solo podía ser detectado en SNC y esporádicamente en otros tejidos.

El éxito de PCR depende además de varios factores que deben ser controlados para que no influyan negativamente en la sensibilidad y especificidad de la técnica (Hoofar et al., 2004). Uno de estos es la calidad de la muestra de ADN que varía de acuerdo al método de extracción y purificación utilizado (Dubey and Echara, 2006). Con respecto a este punto, en el presente trabajo se obtuvieron resultados negativos con PCR en los fetos controles cuando se utilizó Chelex 100 (Walsh et al., 1991) con respecto a la extracción del ADN con el el kit Qiagen, que fue superior (Tabla 14). Asimismo, se han diseñado una gran variedad de protocolos y primers para PCR de *N. caninum* algunos de los cuales poseen controles internos como el PCR MIMIC (Ellis et al., 1999), o PCR multiplex desarrollado por Baszler et al. (1999).

Coincidentemente al trabajo de Sager et al. (2001) PCR fue la técnica más sensible ya que permitió identificar *N. caninum* en la mayoría de los SNC de los fetos bovinos (entre estos 5 especímenes con diagnóstico indeterminado). Sin embargo, en los casos en los que no se pudo realizar dicha técnica por insuficiente muestra, el diagnóstico se arribó en base a la presencia de lesiones histopatológicas en SNC e IHQ (Tabla 14). En coincidencia con Pereira- Bueno et al. (2003) se concluye que para aumentar la detección de *N. caninum* en los fetos bovinos abortados es necesario combinar las técnicas diagnósticas mencionadas.

### 5.3.2. *Tritrichomona foetus*

El diagnóstico de la trichomonosis bovina se basa principalmente en el examen microscópico de las muestras provenientes de lavajes prepuciales, MCV o contenido de abomaso de los fetos en las cuales pueden estar presentes los protozoos (Campero et al., 1983). Este procedimiento resulta laborioso especialmente cuando son pocos los

organismos presentes en las muestras (Nickel et al., 2002). Además, mediante la observación microscópica, puede haber resultados falsos positivos identificándose otras especies de Trichomonads (*Pentatrichomonas* spp o *Tetratrichomonas* spp) en esmegma prepucial de toros vírgenes (Bon Durant et al., 1999, Campero et al., 2003, Agnew et al., 2008, Corbeil et al., 2008). Por estos motivos en varios trabajos se ha desarrollado la técnica de PCR (Felleisen, 1997, Hayes et al., 2003, Parker et al., 2001, BonDurant et al., 2003, Mutto et al., 2006, Cobo et al., 2007) que permite incrementar la especificidad y sensibilidad diagnóstica para *T. foetus* en comparación con los métodos tradicionales de diagnóstico. La mayoría de los trabajos con PCR, se realizaron en muestras de esmegma prepucial y en medios de cultivo con el protozoo. Sin embargo, en el trabajo de Bon Durant et al. (2003) se encontraron fetos abortados naturalmente positivos con PCR a *T. foetus* en muestras de parafina. En el presente estudio, la técnica de PCR fue positiva en dos fetos a partir de muestras congeladas y del cultivo, pero no se detectó en tejidos incluidos en parafina pese a que se utilizó el mismo kit (Qiagen) que en el trabajo de Bon Durant et al. (2003). Esto podría explicarse porque a diferencia del trabajo de Parker et al. (2001), en el presente estudio no se determinó la sensibilidad de PCR, este hecho, sumado a las numerosas variables de esta técnica pudieron haber influido negativamente en los resultados obtenidos. Por otro lado, tendría que considerarse la severa autólisis que presentaban los fetos (grado 3) la cual pudo haber actuado en detrimento de la técnica. Al respecto, algunos autores (Rossen et al., 1992, Powell et al., 1994) determinaron la existencia de varias sustancias inhibidoras en ciertas muestras biológicas que podían interferir con la reacción de PCR.

Finalmente, está reportado (Campero and Cobo, 2006) que el hallazgo microscópico más frecuente en los fetos abortados por *T. foetus* es la bronconeumonía piogranulomatosa, con presencia de ocasionales células gigantes, enteritis necrotizante y flagelados libres o fagocitados. En el presente estudio, la lesión principal fue una bronconeumonía no supurativa y coincidentemente a lo mencionado, se observaron algunas células gigantes en el tejido pulmonar y macrófagos alveolares conteniendo en su interior a los flagelados, los cuales fueron identificados mediante IHQ.

#### 5.4. Malformaciones congénitas

Los defectos congénitos son anomalías de estructura, formación o función que se observan al nacimiento. Estos pueden afectar a una única estructura o función

anatómica, a un sistema completo, partes de varios sistemas, o puede involucrar a varios sistemas del cuerpo (Leipold et al., 1992). En general, las anomalías genéticas son más probables que resulten en mortalidad embrionaria aunque algunas pueden conducir a pérdidas fetales por deformaciones que causan severas distocias (Jonker, 2004).

Muchos defectos congénitos tienen claramente establecida la causa, otros son ocasionados por causas ambientales, factores genéticos o por interacción genético-ambiental. Dentro de las causas ambientales se han reportado diversos agentes teratogénicos como plantas tóxicas, virus, drogas y agentes físicos como radiación, hipertermia, y la palpación temprana para el diagnóstico de preñez (Leipold et al., 1992). Los abortos de origen genético escapan a la capacidad de rutina de diagnóstico, excepto para los que ocurren al final de la gestación y presentan alguna anomalía fenotípica, por ejemplo osteoporosis congénita que es inherente a un rasgo autosómico recesivo en los terneros de raza Angus.

En el presente estudio se observaron malformaciones congénitas como hidrocefalia, malformación de la médula cervical, artrogriposis y desarrollo incompleto del morro. La hidrocefalia es la acumulación anormal de líquido cefalorraquídeo (LCR) en el sistema ventricular. Ocurre en respuesta a una sobreproducción de LCR o más frecuentemente por bloqueo en la circulación del LCR debido a la obstrucción del acueducto de Silvio, malformaciones esqueléticas en la base del cráneo y obstrucción en el espacio aracnoides cerebral. Esta patología no causa muerte en el feto, pero en respuesta a esta condición se puede desarrollar presión intracraneal excesiva causando la muerte del ternero en los primeros días de vida (Colin, 1994).

Los defectos de la columna vertebral involucran la columna espinal, como fusión alanto-occipital, xifosis, lordosis, escoliosis y tortícolis. Estos defectos pueden presentarse solos o combinados entre ellos o asociados con defectos de otros sistemas (Leipold et al., 1992).

La artrogriposis es una contractura articular permanente presente al nacimiento. Es un problema en los bovinos que incluye más de una etiología (Leipold et al., 1992). Es una rigidez articular congénita con deformación del esqueleto apendicular lo más común en el bovino es la deformación de los miembros, hipoplasia muscular, atrofia de nervios en asociación con ligamentos más cortos y carencia de tejido conectivo bajo la piel. Tanto agentes infecciosos como no infecciosos (diversas plantas tóxicas) pueden inducir este tipo de lesión (Jamaluddin et al., 1996). Desafortunadamente, en el presente estudio no se pudieron dilucidar las causas que provocaron las malformaciones congénitas mencionadas.

## 6. CONCLUSIONES

1- El aborto bovino es la consecuencia de un conjunto de factores que pueden actuar conjunta o independientemente y por lo tanto no se lo debería considerar como un hecho aislado, sino como un síndrome que afecta a una determinada población.

2- Las causas infecciosas son las principales responsables en la etiología del aborto bovino (46,0 %), siendo *N. caninum* el organismo identificado con mayor frecuencia (22/150, 14,6 %).

3- Para incrementar el la eficiencia del diagnóstico en el aborto bovino debería realizarse una adecuada recolección y conservación del material abortado (autólisis), utilizar en lo posible protocolos estandarizados en los laboratorios para las pruebas diagnósticas y realizar una investigación epidemiológica que abarque a todos los factores de riesgo implicados en este síndrome (prácticas de manejo, clima, enfermedades previas, existencia de enfermedades endémicas, etc) siendo para ello fundamental una anamnesis completa aportada por el veterinario clínico actuante.

4- Con la implementación de la técnica de PCR se diagnosticaron 15 casos de aborto que presentaban diagnóstico indeterminado por los métodos convencionales. Por lo tanto, los resultados obtenidos con esta técnica molecular permitieron por un lado incrementar el diagnóstico etiológico en un 10,0 %, y por otro lado confirmar las hipótesis postuladas en el presente estudio.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. **ADAMS, L.G.** (2002) The pathology of brucellosis reflects the outcome of the battle between the host genome and the *Brucella* genome. *Vet. Microbiol.* 90: 553-561.
2. **AGERHOLM, J.S., WILLADSEN, C.M., NIELSEN, T.K., GIESE, S.B., HOLM, E., JENSEN, L. and AGGER, J.F.** (1997) Diagnostic studies of abortion in danish dairy herds. *J. Vet. Med. A.* 44: 551-558.
3. **AGNEW, D.W., MUNSON, L., COBO, E.R., OLESEN, D., CORBEIL, L.B. and BONDURANT, R.H.** (2008) Comparative histopathology and antibody responses of non-*Tritrichomonas foetus* trichomonad and *Tritrichomonas foetus* genital infections in virgin heifers. *Vet. Parasitol.* 151: 170-180.
4. **AKCAM, F.Z., YAYLI, G., USKUN, E., KAYA, O. and DEMIR, C.** (2006) Evaluation of the Bactec microbial detection system for culturing miscellaneous sterile body fluids. *Res. Microbiol.* 157: 433-436
5. **ALEGRE M, NANNI M, FONDEVILA N.** (2001) Development of a multiplex polimerase chain reaction for the differentiation of bovine herpesvirus-1 and 5. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Healt.* 48(8): 613-621.
6. **ALEXANDER, B., SCHNURRENBERGER, P.R. and BROWN, R.R.** (1981) Numbers of *Brucella abortus* in the placenta, umbilicus and fetal fluid of two naturally infected cows. *Veterinary Record.* 108: 500.
7. **ALONSO-ANDICOBERRY, C., GARCIA-PEÑA, F.J. and ORTEGA-MORA, L.M.** (2001) Epidemiología, diagnóstico y control de la leptospirosis bovina (revisión). *Prod. Sanid. Anim.* 16: 205-209.
8. **ALVES, D., McEWEN, B., HAZLETT, M., MAXIE, G. and ANDERSON, N.** (1996) Trends in bovine abortions submitted to the Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural affairs, 1993-1995. *Can. Vet. J.* 37: 287-288.
9. **AL-SOUD, W.A. and RADSTRÖM, P.** (2000) Effects of Amplification Facilitators on Diagnostic PCR in the Presence of Blood, Feces, and Meat. *Am. Soc. Microbiol.* 38: 4463-4470.
10. **ALTON, G.G., JONES, L.M. and PIETZ, D.E.** (1975) Laboratory Techniques in Brucellosis. Monograph Series. WHO, Geneva, Switzerland.
11. **AMBROSI, M., CAMERON, N. and DAVIS, B.** (2005) Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. *Org. and Biom. Chem.* 3: 1593-1608.

12. **ANDERSON, T.D., MEADOR, V.P., and CHEVILLE, N.F.** (1986) Pathogenesis of Placentitis in the Goat Inoculated with *Brucella abortus* . I. Gross and Histologic Lesions. Vet. Pathol. 23: 219-226.
13. **ANDERSON, M.L., BLANCHARD, P.C., BARR, B.C. and HOFFMAN, R.L.** (1990) A survey of causes of bovine abortion occurring in the San Joaquin Valley, California. J. Vet. Diagn. Invest. 2: 283-287.
14. **ANDERSON, M.L., BLANCHARD, P.C., BARR, B.C., DUBEY, J.P., HOFFMAN, R.L. and CONRAD, PA.** (1991) Neospora-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. J Am Vet Med Assoc 198(2): 241-244.
15. **ANDERSON, M.L., BONDURANT, R.H, CORBEIL, R.R. and CORBEIL, L.B.** (1996). Immune and inflammatory responses to reproductive tract infection with *Tritrichomonas foetus* in immunized and control heifers. J. Parasitol. 82: 594-600.
16. **ANDERSON, M.L., REYNOLDS, J.P., ROWE, J.D., PACKHAM, A.E., BARR, B.C. and CONRAD, P.A.** (1997) Evidence of vertical transmission of *Neospora sp.* Infection in dairy cattle. J. Amm. Vet. Med. Assoc. 210: 1169-1172.
17. **ANDERSON, M.L., ADRIANARIVO, A.G. and CONRAD, P.A.** (2000) Neosporosis in catttle. Anim. Reprod. Sci. 60-61: 417-431.
18. **ANDERSON, M.L.** (2007) Infectious causes of bovine abortion during mid- to late-gestation. Theriogenology. 68: 474-486.
19. **ANDERSON, T.D, MEADOR, V.P. and CHEVILLE, N.F.** (1986) Pathogenesis of Placentitis in the Goat Inoculated with *Brucella abortus*. I. Gross and Histologic Lesions. Vet. Pathol. 23: 219-226.
20. **ANON.** (1983) Listeric infection in farm animals. Vet. Rec. 112: 314
21. **ATKINSON, R., HARPER, P.A.W., REICHEL, M.P. and ELLIS, J.T.** (2000) Progress in the Serodiagnosis of *Neospora caninum* Infections of Cattle. Parasitol. Today. 16: 110-114.
22. **AVILA SÁNCHEZ, M.; RODRÍGUEZ MEDINA, M.; DÍAZ de ARCE, H. and BARRERA VALLE, M.** (2008) Diagnóstico virológico de Herpesvirus Bovino tipo-1. Revista electrónica de Veterinaria (REDVET). IX (3): 1695-7504.
23. **BABIUK, L.A., van DRUNEN LITTEL-van den HURK, S. and TIKOO, S.K.** (1996) Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. Vet. Microbiol. 53: 31-42.

24. **BAILY GG, KRAHN JB, DRASAR BS, STOKER NG.** (1992) Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J Trop Med Hyg.* 95(4): 271-275.
25. **BARKHORDARI, A., STODDART, R., Mc CLURE, S. and Mc CLURE, J.** (2004) Lectin histochemistry of normal human lung. *J. Mol. Histol.* 35: 147-156.
26. **BARR, B.C., ANDERSON, M.L., BLANCHRAD, P.C., DAFT, B.M., KINDE, H. and CONRAD, PA.** (1990) Bovine fetal encephalitis and myocarditis associated with protozoal infections. *Vet. Pathol.* 27: 354-361.
27. **BARR, B.C., ANDERSON, M.L., DUBEY, J.P. and CONRAD, PA.** (1991) Neospora-like protozoal infections associated with bovine abortions. *Vet. Pathol.* 28: 110-116.
28. **BARR, B.C. and ANDERSON, M.L.** (1993) Infectious diseases causing bovine abortion and fetal loss. *Vet. Clin. N. Am.* 9: 343-368.
29. **BARR, B.C., ROWE, J.D., SVERLOW, K.W., BONDURANT, R.H., ARDANS, A.A., OLIVER, M.N. and CONRAD, P.A.** (1994) Experimental reproduction of bovine fetal *Neospora* infection and death with a bovine *Neospora* isolate. *J. Vet. Diag. Invest.* 6: 207-215.
30. **BARR, B.C., ANDERSON, M.L., SVERLOW, K.W. and CONRAD, P.A.** (1995) Diagnosis of bovine fetal *Neospora* infection with an indirect fluorescent antibody test. *Vet. Rec.* 137: 611-613.
31. **BARTLEY, P.M., KIRVAR, E., WRIGHT, S., SWALES, C., ESTEBAN-REDONDO, I., BUXTON, D., MALEY, S.W., SCHOCK, A., RAE, A.G., HAMILTON, C. and INNES, E.A.** (2003) Maternal and fetal immune responses of cattle inoculated with *Neospora caninum* at Mid-Gestation. *J. Comp. Path.* 130: 81-91.
32. **BARTLET, D.E.** (1949) Procedures for Diagnosis Bovine Venereal Trichomoniasis and Handling Affected Herds. *J:A:V:M:A:* 114: 298-305.
33. **BASZLER, T.V., GAY, L.J., LONG, M.T. and MATHISON, B.A.** (1999) Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous bovine abortion. *J. Clin. Microbiol.* 37: 4059-4064.
34. **BATT, C.A** (1997) Symposium: Molecular Probes-Theory and Application. *Molecular Diagnostics for Dairy-Borne Pathogens.* *J Dairy Sci.* 80: 220-229.
35. **BAUMGARTEN, D.** (2002) Brucellosis: a short review of the disease situation in Paraguay. *Vet. Microbiol.* 90: 63-69.

36. **BECKSTEAD, J.H.** (1994) A simple technique for preservation of fixation-sensitive antigens in paraffin-embedded tissues. *J. Histochem. Cytochem.*
37. **BERGEY** (Manual) 1984. Section 10 The Mycoplasmas.
38. **BONDURANT, R.H.** (1997) Pathogenesis, diagnosis, and management of trichomoniasis in cattle. *Vet. Clin. N. Am. Food. Anim. Pract.* 13: 345-361.
39. **BONDURANT, R.H. and ANDERSON, M.L.** (1997) Epizootic bovine abortion. IN Youngquist, R.S (Ed) *Current Therapy in Large Animal. Theriogenology.* WB Saunders Co., Philadelphia, PA, pp. 386-389.
40. **BONDURANT, R.H., GAJADHAR, A., CAMPERO, C.M., JOHNSON, E., LUN, Z.R., NORDHAUSEN, R.W., VAN HOOSEAR, K.A., VILLANUEVA, M.R. and WALKER, R.L.** (1999) Preliminary characterization of a *Tritrichomonas foetus*-like protozoan isolated from preputial esmegma of virgin bulls. *Bov. Pract.* 33: 124-127.
41. **BONDURANT, R.H., CAMPERO, C.M., ANDERSON, M.L. and VAN HOOSEAR, K.A.** (2003) Detection of *Tritrichomonas foetus* by polymerase chain reaction in cultured isolated, cervicovaginal mucus, and formalin-fixed tissues from infected heifers and fetuses. *J. Vet. Diagn. Invest.* 15: 579-584.
42. **BONDURANT RH.** (2005) Venereal diseases of cattle: natural history, diagnosis, and the role of vaccines in their control. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 21(2): 383-408.
43. **BONDURANT, R.H.** (2007) Selected diseases and conditions associated with bovine conceptus loss in the first trimester. *Theriogenology.* 68: 461-473.
44. **BOSCHIROLI, M.L., FOULOGNE, V. and CALLAGHAN, D.O.** (2001) Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Current Opinion in Brucellosis.* 4: 58-64.
45. **BRAMBELL, F.W.R.** (1958) The passive immunity of the young mammal. *Biol. Rev.* 33: 488-531.
46. **BRAUN, R.K., OSBURN, B.I., KEBDRICK, J.W.** (1973) Immunologic response of bovine fetus to bovine viral diarrhea virus. *Am. J. Vet. Res.* 34: 1127-1132.
47. **BRICKER, B.J. and HALLING, S.M.** (1994) Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32: 2660-2666.
48. **BRICKER, B.J. and HALLING, S.M.** (1995) Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR Assay for Differentiation of *Brucella abortus* Vaccine Strains S19 and RB51. *J. Clin. Microbiol.* 33: 1640-1642.

- 49. BRICKER, B.J.** (2002) PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet. Microbiol.* 90: 435-446.
- 50. BROCK, K.V.** (1995) Diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. *Vet. Clin. North Am. Food Anim Pract.* 11 (3): 549-561.
- 51. BRODERSEN, B.W.** (2004) Immunohistochemistry used as a screening method for persistent bovine viral diarrhea virus infection. *Vet. Clin. North Am. Food Anim Pract.* 20(1): 85-93.
- 52. BROWER, A., HOMB, K.M., BOCHSLER, P., PORTER, R., WOODS, K., UBL, S., KRUEGER, D., CIGEL, F. and TOOHEY-KURTH, K.** (2008) Encephalitis in aborted bovine fetuses associated with Bovine herpesvirus 1 infection. *J Vet. Diagn. Invest.* 20:297-303.
- 53. BROWN, T.T., SCHULTZ, R.D., DUNCAN, J.R, et al.** (1979) Serologic response of the bovine fetus to bovine viral diarrhea virus. *Infect Immune.* 25: 93-97.
- 54. BUXTON, D., Mc ALLISTER, M.M. and DUBEY, J.P.** (2002) The comparative pathogenesis of neosporosis. *Trends in Parasitol.* 18: 546-552.
- 55. CAMPERO, C.M., PALLADINO, M.R. and VILLAR, J.A.** (1983) Actualización sobre la Trichomoniasis Bovina. Revisión Bibliográfica. *Rev. Arg. Prod.Anim.* 3 (5): 387-432.
- 56. CAMPERO, C.M., CATENA, M. and MEDINA, D.** (1986) Caldo infusión enriquecido para el cultivo de *Trichomonas foetus*. *Veterinaria Argentina.* 3: 80-81.
- 57. CAMPERO, C.M., CONOSCIUTO, G., ODRIOZOLA, E., MOREIRA, A.R., LODEIRO, R., GARCÍA-BOISSOU, R., HERNAIZ, R.** (1992) Hallazgos clínicos, bacteriológicos, e histopatológicos en vacas lecheras asociados con problemas reproductivos. *Rev. Med. Vet.* 73: 264-272.
- 58. CAMPERO, C.M., MOREIRA, A.R., DAGUERRE, S., BARTOLOME, J. and ODRIOZOLA, E.** (1993) Aborto bovino asociado a *Haemophilus somnus*. *Veterinaria Argentina.* 10: 404-409.
- 59. CAMPERO, C.M., ODRIOZOLA, E., ODEON, A.C. and CASARO, A.P.** (1994) The causes of abortion and death occurring in calves during their first week of life in the south-east of Buenos Aires province, Argentina. *Proceedings of the VII International Symposium of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Buenos Aires,* 104.
- 60. CAMPERO, C.M., ANDERSON, M.L., CONOSCIUTO, G., ODRIOZOLA, H., BRETSCHNEIDER, G., POSO, M.A.** (1997a) Neosporosis bovina: una nueva causa de aborto en Argentina. *Terrizo.* 26: 268-271.

- 61. CAMPERO, C.M., ANDERSON, M.L., CONOSCIUTO, G., ODRIOZOLA, H., BRETSCHNEIDER, G., POSO, M.A.** (1998) Neospora caninum associated abortion in dairy herd in Argentina. Vet. Rec. 143: 228-229.
- 62. CAMPERO CM.** (2000) Las enfermedades reproductivas de los bovinos: ayer y hoy. Anales de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria. 53: 88-112.
- 63. CAMPERO CM, ODEÓN AC; CIPOLLA AL, MOORE DP, POSO MA, ODRIOZOLA E.** (2002) Demonstration of *Listeria monocytogenes* by immunohistochemistry in formalin-fixed brain tissues from natural cases of ovine and bovine encephalitis. J. Vet. Med. B 49: 379-383.
- 64. CAMPERO, C.M., MOORE, D.P., ODEON, A.C., CIPOLLA, A.L. and ODRIOZOLA, E.** (2003) Aetiology of bovine abortion in Argentina. Vet. Res. Comm. 27: 359-369.
- 65. CAMPERO, C.M., RODRIGUEZ DUBRA, C., BOLONDI, A., CACCIATO, C., COBO, E., PEREZ, S., ODEÓN, A., CIPOLLA, A. and BONDURANT, R.H.** (2003) Two-step (culture and PCR) diagnostic approach for differentiation of non-*T. foetus* trichomonads from genitalia of virgin beef bulls in Argentina. Vet. Parasitol. 112: 167-175.
- 66. CAMPERO,C.M., ANDERSON, M.L., WALKER, R.L., BLANCHARD, P.C., BARBANO, L., CHIU, P., MARTINEZ, A., COMBESSIES, G., BARDON, J.C. and CORDEVIOLA, J.** (2005) Immunohistochemical Identification of *Campylobacter fetus* in Natural Cases of Bovine and Ovine Abortions. J. Vet. Med. B. 52: 138-141.
- 67. CAMPERO, C.M.** (2005) Consideraciones sobre la Trichomoniasis y Campylobacteriosis bovina. Revista del Colegio de Veterinarios Prov. Buenos Aires. 32: 47-51.
- 68. CAMPERO, C.M. and COBO, E.R.** (2006) Tritrichomonas foetus: patogénesis de la mortalidad embrionaria/fetal, caracterización de antígenos vacunales y respuesta inmune inducida. Revista de Medicina Veterinaria. 87(2): 47-56.
- 69. CAMPERO, C.M.** (2006) Causas infecciosas y parasitarias del aborto bovino. Mundo Ganadero. 17(191): 31-35.
- 70. CAMPERO, C.M., MOORE, D.P., PAOLICCHI, F.A., MOREIRA, A.R., MORRELL, E., ODEÓN, A.C., CANTÓN, G., WEBER, N., RODRIGUEZ, A. and ODRIOZOLA, E.** Causes of bovine abortion in Argentina. Congreso mundial Buiatría, Santiago, Chile. 14-18 de noviembre de 2010.

71. CARVALHO NETA, A.V., MOL, J.P., XAVIER, M.N., PAIXAO, T.A., LAGE, A.P. and SANTOS R.L. (2010) Pathogenesis of bovine brucellosis. *Vet. J.* 184: 146-155.
72. CARMAN, S., VAN DREUMEL, T., RIDPATH, J., HAZLETT, M., ALVES, D., DUBOVI, E., TREMBLAY, ROB., BOLIN, S., GODKIN, A. and ANDERSON, N. (1998) Severe acute bovine diarrhea in Ontario, 1993-1995. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10: 27-35.
73. CARPENTER, T.E., CHRIEL, M., ANDERSEN, M.M., WULFSON, L., JENSEN, A.M., HOUE, H and GREINER, M. (2006) An epidemiologic study of late-term abortions in dairy cattle in Denmark, July 2000- August 2003. *Prev. Vet. Med.* 77: 215-229.
74. CARTUN, R. (1995) Immunohistochemistry of Infectious Diseases. *J. Hist.* 18: 195-201.
- 75- CASARO, A., KENDRICK, J. and KENNEDY, P. (1971) Response of the bovine fetus viral diarrhea-mucosal virus. *Am. J. Vet. Res.* 32:1543-1562.
76. CASTEEL, S. (1997) Reproductive toxicology. In: Youngquist R (ed). *Current Therapy in Large Animal theriogenology*. WB Saunders Company, University of Missouri, USA, pp 392-399.
77. CELLI, J. (2006) Surviving inside a macrophage: The many ways of *Brucella*. *Res. Microbiol.* 157: 93-98.
78. CETINKAYA, B., ÖNGÖR, H., MUZ, A., ERTAS, H.B., KELENDER, H. and ERDOGAN, H.M. (1999) Detection of *Brucella* species DNA in the stomach content of aborted sheep fetuses by PCR. *Vet. Rec.* 144: 239-240.
79. CIPOLLA, A.L., CASARO, A.P., TERZOLO, H.R., ESTELA, E.S., BROOKS, B.W. and GARCÍA, M.M. (1994) Persistence of *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* in experimentally infected heifers. *Vet. Rec.* 134: 628.
80. CIPOLLA, A, CAMPERO, C, MEDINA, D, MORSELLA, C, COSENTINO, B *et al.* (1995<sup>a</sup>) Un método mejorado para el diagnóstico de la campylobacteriosis genital en vacas. 19° Congress AAPA. XIV Annual Meeting A:L.P.A.. p. 742.
81. CIPOLLA, A.L., PAOLICCHI, F.A., POSO, M.A., MORSELLA, C.G., CASARO, A.P., MASSONE, A.R., VILLEGAS, R., CALLEJAS, S. and GIMENO, E.J. (1998) Lectin-binding sites in uterus and oviduct of normal and *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis*-infected heifers. *Eur. J. Histochem.* 42: 63-70.

- 82. CIPOLLA, A.L.** (2000) Patógenos emergentes que afectan la reproducción. Terceras Jornadas de Reproducción Bovina, Villa María, Córdoba, 1 y 2 septiembre. p.85-99.
- 83. CLARK, B.L., DUFTY, J.H. and PARSONSON, I.M.** (1977): Studies in the transmission of *Trichostrongylus axei*. Aust. Vet. J. 53: 170-172.
- 84. CLARK, B.L.** Venereal Disease of cattle. In: Veterinary Review. The University of Sidney The post-graduate Foundation in Veterinary Science (Ed). 1971, vol 11. p.1-25.
- 85. CLARK, D.A, ARCK, P.C. and CHAOUAT, G.** (1999) Why did your mother reject you? Immunogenetic determinants of the response to environmental selective pressure expressed at the uterine level. Am. J. Reprod. Immunol. 41: 5-22.
- 86. CLARK, D.A, CROITORU, K.** (2001) Th1/Th2, 3 imbalance due to cytokine-producing NK, gamma delta T and NK-gamma-delta T cells in murine pregnancy deciduas in success or failure of pregnancy. Am. J. Reprod. Immunol. 45: 257-265.
- 87. COBO E, CIPOLLA, A, MORSELLA, C, CANO, D, CAMPERO, C.** (2003) Effect of two comercial vaccines to *Campylobacter fetus* subspecies on heifers naturally challenged. J. Vet. Med. series B, 50, 75-80
- 88. COBO, E.R., CAMPERO, C.M., GIMENO, E.J. and BARBEITO, C.G.** (2004) Lectin binding patterns and immunohistochemical antigen detection in the genitalia of *Trichostrongylus axei*-infected heifers. J. Comp. Path. 131: 127-134.
- 89. COBO, E.R., FAVETTO, P.H, LANE, V.M, FRIEND, A, VAN HOOSER, K, MITCHELL, J. and BON DURANT, R.H.** (2007) Sensitivity and specificity of culture and PCR of smegma samples of bulls experimentally infected with *Trichostrongylus axei*. Theriogenology 68 (6): 853-860.
- 90. CONRATHS, F.J., SCHARES, G.** (2006) Validation of molecular-diagnostic techniques in the parasitological laboratory. Vet. Parasitol. 136: 91-98.
- 91. COLIN, G. R.** (1994). Congenital Defects as a Cause of Perinatal Mortality of Beef Calves. Vet. Clin. North Am. Food Anim Pract. 1(10): 35-49.
- 92. COLLANTES-FERNANDEZ, E., RODRIGUEZ-BERTOS, A., ARNAIZ-SECO, I., MORENO, B., ADURIZ, G., ORTEGA-MORA, L.M.** (2005) Influence of the stage of pregnancy on *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions in aborted bovine foetuses. Theriogenology. 65: 629-641.
- 93. COLLANTES-FERNANDEZ, E., ARNAIZ-SECO, I., MORENO BURGOS, B., RODRIGUEZ-BERTOS, A., ADURIZ, G., FERNANDEZ-GARCIA, A. and ORTEGA-MORA, L.M.** (2006) Comparison of *Neospora caninum* distribution,

parasite loads and lesions between epidemic and endemic bovine abortion cases. *Vet. Parasitol.* 142:187-191.

**94. COMMITTEE ON BOVINE REPRODUCTIVE NOMENCLATURE (1972)** Recommendations for standardizing bovine reproductive terms. *Cornell Vet.* 62: 216-237.

**95. CONRAD, P.A., SVERLOW, K., ANDERSON, M., ROWE, J., BONDURANT, R., TUTER, G and et al. (1993b)** Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5: 572-578.

**96. CORBELLINI, L.G., DRIEMEIER, D., CRUZ, C.F.E., GONDIM, L.F.P. and WALD, V. (2002)** Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Vet. Parasitol.* 103: 195–202.

**97. CORBELLINI, L.G., PESCADOR, C.A., FRANTZF.J., De LIMA, M., FERREIRO, L. And DRIEMEIER, D. (2003)** Abortus by *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus niger* in cattle in southern Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 23(2): 82-86.

**98. CORBELLINI, L.G., PESCADOR, C.A., FRANTZ, F., WUNDER, E., STEFFEN, D., SMITH, D.R. and DRIEMEIER D. (2006)** Diagnostic survey of bovine abortion with special reference to *Neospora caninum* infection: Importance, repeated abortion and concurrent infection in aborted fetuses in Southern Brasil. *Vet. J.* 172: 114-120.

**99. CORBEIL, M.J. and EADES, S.M. (1973)** The effect of soluble extracts of bovine placenta on the growth of fungi implicated in bovine mycotic abortion. *Br. Vet. J.* 129: 75-79.

**100. CORBEIL, L.B. and BONDURANT, R.H. (2001)** Immunity to bovine reproductive infections. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.* 17: 567-583.

**101. CORBEIL, L.B., CAMPERO, C.M., RHYAN, J.C. and BONDURANT, R.H. (2003)** Vaccines against sexually transmitted diseases. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1: 118.

**102. CORBEIL, L.B, CAMPERO, C.M, VAN HOOSEAR, K. and BONDURANT, R.H. (2008)** Detection of trichomonad species in the reproductive tracts of breeding and virgin bulls. *Vet Parasitol.* 154 (3-4): 226-232.

**103. CORNER, L.A. and ALTON, G.G. (1982)** Bovine Brucellosis standard bacteriological techniques. SCA-Animal Health Committee. Sub-committee of principal laboratory officers. Published : Australian Bureau of Animal Health.

**104. CORNISH, T.E., VAN OLPHEN, A.L., CAVENDER, J.L., EDWARDS, J.M., JAEGER, P.T., VIEYRA, L.L., WOODARD, L.F., MILLER, D.R. and O'TOOLE,**

- D. (2005) Comparison of ear notch immunohistochemistry, ear notch antigen-capture ELISA, and buffy coat virus isolation for detection of calves persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *J.Vet. Diag.Invest.* 17(2): 110-117.
- 105. CORTEZ, A., SCARCELLI, E. and SOARES, R.M.** (2001) Detection of *Brucella* DNA from aborted bovine foetuses by polymerase chain reaction. *Aust. Vet. J.* 79: 500-501.
- 106. COSTA, E.F., FAZZIO, L.E., TRAVERIA, G.E., SANCHEZ, R.O., ALVARADO PINEDO, M.F., MATTIOLI, G.A., OTERO, M.M., CHIALVA, M. and ROMERO, J.R.** (2004) Causas de mortalidad y aborto en bovinos. Informe de 1163 casos entre 1986 y 2001 en la provincia de Buenos Aires. *Revista de Medicina Veterinaria.* 85: 16-22.
- 107. DAGLEISH, M.P., BENAVIDES, J. and CHIANINI, F.** (2010) Immunohistochemical diagnosis of infectious diseases of sheep. *Small Rum. Res.* In Press.
- 108. DA SILVA, T.M.A., GONZAGA de OLIVEIRA, R, PINTO da SILVA MOL, J., XAVIER, M.N., ALVEZ da PAIXAO, T, CORTEZ, A., HEYNEMANN, M.B., RICHTZENHAIN, L.J., PEREIRA LAGE, A. and DE LIMA SANTOS, R.** (2009) Diagnóstico etiológico del aborto infeccioso bovino por PCR. *Ciencia Rural, Santa María.* 39 (9): 2563-2570.
- 109. DEAS, W.** (1981) Non-brucella abortion in cattle. *In Pract. March:* 14-19.
- 110. del CAMPO, M.R., MUÑOZ, O. and del CAMPO, C.H.** (1971) Comparación de dos métodos para el aislamiento de *Thichomona Foetus* en toro. *Aust. Med. Vet.* 3 (2): 84-87.
- 111. DELGADO, I.; BARRERA, M.; TUERO, C. and RODRÍGUEZ, N.** (1992): Comparación de tres métodos de detección de antígeno para el diagnóstico de HVB-1. *Rev. Salud Anim.* 14: 143-148.
- 112. DELGADO, F., BRIHUEGA, B. VENZANO, A. FUNES, D. VIERA, F.B., AUTERI, C. ROMERO, G., CAPELLINO, F. and SARMIENTO, L.** (2007) Adaptation of an immunohistochemistry protocol for the detection of *Leptospira spp.* in samples of formaldehyde-fixed tissue. *Revista Cubana de Medicina Tropical.* 59 (1):
- 113. DENNIS SM.** (1980) Infectious bovine abortion: a practitioner's approach to diagnosis. *Vet Med Small Anim Clin.* 75(3):459-66.
- 114. DI PAOLO, L.A., ANCINAS, M.D., TRAVERIA, G.E., ALVARADO PINEDO, M.F., SANABRIA, R., TASSARA, F., PERALTA, L.M., ROMERO, J.**

**And ROMERO, J.R** (2008) Análisis retrospectivo de casuística de abortos bovinos (período 2002-2006).VI Reunión Argentina de Patología Veterinaria. II Seminario argentino de la Fundación Charles C. Davis. FCV. UNNE. 16 al 19 de julio.

**115. DISKIN, M.G. and MORRIS, D.G.** (2008) Embryonic and Early Foetal Losses in Cattle and Other Ruminants. *Reprod. Dom. Anim.* 43 (2): 260-267.

**116. DJADID, N.D., GANJI, Z.F., GOUYA, M.M., REZVANI, M. and ZAKERI, S.** (2009) A simple and rapid nested polimerase chain reaction – restriction fragment lenght polymorphism technique for differentiation of pathogenic and non pathogenic *Leptospira spp.* *Diagn.Microbiol. Infect. Dis..* 63: 251-256.

**117. DJISTRA, T., BARKEMA, H.W., EYSKER, M., WOUDA, W.** (2001) Evidence of post-natal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds. *Int. J. Parasitol.* 31: 209-215.

**118. DOIG, P.A.** (1981) Bovine Genital Mycoplasmosis. *Can.Vet. J.* 22: 339-343.

**119. DOMINGO, M., RAMOS, J.A., DOMINGUEZ, L., FERRER, L. And MARCO, A.** (1986) Demostration of *Listeria monocytogenes* with the PAP technique in formalin fixed and paraffin embedded tissues of experimentally infected mice. *Journal of Veterinary Medicine B.* 33: 537-542.

**120. DRAGHI, M.G., SONI, C.A., BECKWITH, B., ZURBRIGGEN, M.A., HOMSE, A.C., ROCHINOTTI, D., ALCARAZ, E.L., RIZZI, C., CASPE, S.G., RAMÍREZ, J.C., PEREYRA, M. and BIOTTI, G.M.** (2006) Principales causas de mortalidad perinatal en bovinos en el Nordeste Argentino. *Revista de Medicina Veterinaria* 87(4): 140-143.

**121. DRISKELL, E.A. and RIDPATH, J.F.** (2006) A survey of bovine viral diarrhea virus testing in diagnostic laboratories in the United States from 2004 to 2005. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18(6): 600-605.

**122. DUBEY, J.P. and BERGERON, J.A.** (1982) Sarcocystis as a cause of placentitis and abortion in cattle. *Vet. Pathol.* 19: 315-318.

**123. DUBEY, J.P.** (1983) Distribution of cysts and tachyzoites in calves and pregnant cows inoculated with *toxoplasma gondii* oocysts. *Vet. Parasitol.* 13: 199-211.

**124. DUBEY, J.P.** (1986) A review of toxoplasmosis in cattle. *Vet. Parasitol.* 22: 177-202.

**125. DUBEY, J.P., SPEER, C.A. and FAYER, R.** (1989) Sarcocystosis of animals and man. CRC Press, Boca Ratón, FL 215 p

- 126. DUBEY, J.P., CARPENTER, J.L., SPEER, C.A., TOPPER, M.J. and UGGLA, A.** (1988a). Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J.Am.Vet.Med. Assoc.* 193: 1259-1263.
- 127. DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S., ANDERSON, M.L., DAVIS, S.W. and SHEN, S.K.** (1992) Induced transplacental transmission of *Neospora caninum* in cattle. *J.A.V.M.A.* 201: 709-713.
- 128. DUBEY, J.P. and LINDSAY, D.S.** (1996) A review of *Neospora caninum* and Neosporosis. *Vet. Parasitol.* 67: 1-59.
- 129. DUBEY, J.P.** (1999) Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Vet. Parasitol.* 84: 349-367.
- 130. DUBEY, J.P., BARR, B.C., BARTA, J.R., BJERKAS, I., BJORKMAN, C. and BLAGBURN, B.L, et al:** (2002) Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidian. *Int. J. Parasitol.* 32: 929-946.
- 131. DUBEY, J.P.** (2003) Neosporosis in cattle. *J. Parasitol.* 89: 42-46.
- 132. DUBEY, J.P.** (2005) Neosporosis in cattle. *Vet. Clin. N. Am. Food. Anim. Pract.* 21: 473-483.
- 133. DUBEY, J.P. and LINDSAY, D.S.** (2006) Neosporosis, Toxoplasmosis, and Sarcocystosis in Ruminants. *Vet. Clin. N. Am. Food. Anim. Pract.* 22: 645-671.
- 134. DUBEY, J.P. and SCHARES, G.** (2006) Diagnosis of bovine neosporosis. *Vet. Parasitol.* 1: 1-34.
- 135. DUBOVI, E.J.** (1994) Impact of bovine viral diarrhea virus on reproductive performance in cattle. *Vet. Clin. N. Am. Food. Anim. Pract.* 10: 503-514.
- 136. DUFTY, J.H.** (1967) Diagnosis of vibriosis in the bull. *Aust. Vet. J.* 43: 433-437.
- 137. DUNNE, L.D., DISKIN, M.G. and SREENAN, J.M.** (2000) Embryo and foetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term. *Anim.Reprod. Sci.* 58: 39-44.
- 138. EASTON, C., PAULLIER, C. and BAÑALES, P.** (2003) Aborto bovino: casuística y optimización del diagnóstico en la DILAVE “Miguel C. Rubino”, Uruguay. *Veterinaria (Montevideo).* 38: 25-30.
- 139. EDMONDSON, M.A., GIVENS, M.D., WALZ, P.H., GARD, J.A., STRINGFELLOW, D.A. and CARSON, R.L.** (2007) Comparison of tests for detection of bovine viral diarrhea virus in diagnostic samples. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19 (4): 76-81.

- 140. EDWARDS, S.** (1990) The diagnosis of bovine virus diarrhoea- mucosal disease in cattle. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 9: 115-130.
- 141. ELLIS WA, O'BRIEN JJ, NEILL SD, FERGUSON HW, HANNA J.** (1982) Bovine leptospirosis: Microbiological and serological findings in aborted fetuses. *Vet. Rec.* 110: 147-150.
- 142. ELLIS WA.** (1994) Leptospirosis as a cause of reproductive failure. *Vet. Clin. N. Am. Food. Anim. Pract.* 10(3): 463-478.
- 143. ELLIS WA.** (1990) Leptospirosis. *OIE Manual: Volume II.*
- 144. ELLIS, J.T., McMILLAN, D., RYCE, C., PAYNE, S., ATKINSON, R. and HARPER, P.A.W.** (1999) Development of a single tube nested polymerase chain reaction assay for the detection of *Neospora caninum* DNA. *Int. J. for Parasitol.* 29: 1589-1596.
- 145. ELLIS TM, ROBERTSON GM, HUSTAS L, KIRBY M.** (1983) Detection of leptospire in tissue using an immunoperoxidase staining procedure. *Aust Vet J.* 60(12): 364-367.
- 146. ENGELS, M., ACKERMANN, M.** (1996) Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. *Vet. Microbiol.* 53: 3-15.
- 147. ENRIGHT, F.M. and OSBURN, B.I.** (1981) Ontogeny of fetal ruminant inflammatory responses. IN: Butler, J.E (Ed), *The ruminant immune system*, Plenum Press, New York, p.768.
- 148. ENTRICAN.** (2002) Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. *J. Comp. Path.* 126: 79-94.
- 149. ESTEBAN-REDONDO, I. and INNES, E.A.** (1997) *Toxoplasma Gondii* infection in sheep and cattle. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 20(2): 191-196.
- 150. EVERMANN, J.F.** (1982) Advances in the diagnosis of infectious bovine abortion. *Bov. Pract.* 17: 36-38.
- 151. EYZAGUIRRE, E. and HAQUE, A.K.** (2008) Application of immunohistochemistry to infections. *Arch. Path. Lab. Med.* 132 (3): 424-431.
- 152. FALK, P., ROTH, K. and GORDON, J.** (1994) Lectins are sensitive tools for defining the differentiation programs of mouse gut epithelial cell lineages. *Am. J. Physiol.* 266: 987-1003.
- 153. FEKETE, A., BANTLE, J.A. and HALLING, S.M.** (1992) Detection of *Brucella* by polymerase chain reaction in bovine fetal and maternal tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4: 79-83.

- 154. FELLEISEN, R.S.J.** (1997) Comparative sequence analysis of 5.8 rRNA genes and internal transcribed spacer (ITS) regions of trichomonadid protozoa. *Parasitol.* 115: 111-119.
- 155. FELLEISEN, R.S.J.** (1999) Host-parasite interaction in bovine infection with *Tritrichomonas foetus*. *Microbes infect.* 1: 807-816.
- 156. FENNESTAD, K.L and BORG-PETERSEN, C.** (1958) Fetal leptospirosis and abortion in cattle. *J. Infect. Dis.* 102: 227-236.
- 157. FERNÁNDEZ, M.E., CAMPERO, C.M., MORRELL, E., CANTÓN, G.J., MOORE, D.P., CANO, A., MALENA, R., ODEÓN, A.C., PAOLICCHI, F. and ODRIOZOLA, E.R.** (2007) Pérdidas reproductivas en bovinos causadas por abortos, muertes prematuras, natimortos y neonatos: casuística del período 2006-2007. *Rev. Med. Vet.* 88 (6): 246-254.
- 158. FERREIRA FIGUEIREDO, J., OLIVEIRA PELLEGRIN, A., BASTOS FOSCOLO, C., MACHADO, P.R., LEITE MIRANDA, K. and PEREIRA LAGE, A.** (2002) Evaluation of direct fluorescent antibody testin for the diagnosis of bovine genital campylobacteriosis. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 44: 118-123.
- 159. FIORENTINO, A., MORRELL, E., DIAB, S., LICOFF, N., CANTÓN, G., SCHETTINO, A., CAMPERO, C.** “Un caso de aborto bovino a *Aspergillus fumigatus*”. X Congreso Argentino de Micología. XX Jornadas Argentinas de Micología. Buenos Aires, 22 al 25 de mayo de 2005.
- 160. FOLEY GL, SCHLAFER DH.** (1987) Candida abortion in cattle. *Vet Pathol.* 24: 532-536.
- 161. FOSTER, G., MacMILLAN, A.P., GODFROID, J., HOWIE, F., ROSS, H.M., CLOECKAERT, A., REID, R.J. BREW, S. and PATTERSON, I.A.P** (2002) A review of *Brucella* sp. Infection of sea mammals with particular emphasis on isolates from Scotland. *Vet. Microbiol.* 90: 563-580.
- 162. FRANCISCO, J. and VARGAS, O.** (2002) Brucellosis in Venezuela. *Vet. Microbiol.* 90: 39-44.
- 163. FRAY, M.D., PATON, D.J. and ALENIUS, S.** (2000) The effects of bovine viral diarrhoea virus on cattle reproduction in relation to disease control. *Anim Reprod Sci.* 60-61: 615-627.
- 164. GALLIEN, P., DORN, C., ALBAN, G., STAAK, C and PROTZ, D.** (1998) Detection of *Brucella* species in organs of naturally infected cattle polimerase chain reaction. *Vet. Rec.* 142: 512-514.

- 165. GARIN-BASTUJI, B., BLASCO, J.M., MARÍN, C. and ALBERT, D.** (2006) The diagnosis of brucellosis in sheep and goats, old and new tools. *Small Rum. Res.* 62: 63-70.
- 166. GERRITSEN, M.J., OLYHOEK, T., SMITS, M.A. and BOKHOUT, B.A.** (1991) Sample Preparation Method for Polymerase Chain Reaction-Based Semiquantitative Detection of *Leptospira interrogans* Serovar Hardjo Subtype Hardjobovis in Bovine Urine. *J. Clin. Microbiol.* 29: 2805-2808.
- 167. CHANG, W and OGG, J.** (1971) Transduction and mutation to glycine tolerance in *Vibrio fetus*. *Am. J. Vet. Res.* 32: 469- 653.
- 168. GÂDICKE, P. and MONTI, G.** (2008). Aspectos epidemiológicos y de análisis del síndrome de aborto bovino. *Arch. Med. Vet.* 40: 223-234.
- 169. GIBBS, E.P.J. and RWEYEMAMU, M.M.** (1977) Bovine Herpesvirus. Part I. *Vet. Bull.* . 47: 317.
- 170. GIVENS, M.D.** (2006) A clinical, evidence-based approach to infectious causes of infertility in beef cattle. *Theriogenology.* 66:648-654.
- 171. GOENS, D.S.** (2002) The evolution of bovine viral diarrhea: a review. *Can. Vet. J.* 43: 946-954.
- 172. GODFROID, J. and KÄSBOHRER, A.** (2002) Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty-first century. *Vet. Microbiol.* 90: 135-145.
- 173. GOGEV, S., GEORGIN, J.P., SCHYNTS, F., VANDERPLSSCHEN, A. and THIRY, E.** (2004) Bovine herpesvirus 1 glycoprotein D expression in bovine upper respiratory tract mediated by a human adenovirus type 5. *Vet. Res.* 35: 715-721.
- 174. GONDIM, L.F.P., McALLISTER, M.M., PITT, W.C. and ZEMLICKA, D.E.** (2004) Coyotes (*canis latrans*) are definitive host of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 34: 159-161.
- 175. GOTTSTEIN, B., HENTRICH, B., WYSS, R., THÜR, B., BUSATO, A., STÄRK, K.D.C. and MÜLLER, N.** (1998) Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. *Int. J. Parasitol.* 28: 679-691.
- 176. GRAHN, R.A., BONDURANT, R.H., VAN HOOSEAR, K.A., WALKER, R.L. and LYONS, L.A.** (2005) An improved molecular assay for *Trichostrongylus axei*. *Vet. Parasitol.* 127: 39-47.
- 177. GRIMARD B, FRERET S, CHEVALLIER A, PINTO A, PONSART C, HUMBLLOT P.** (2006) Genetic and environmental factors influencing first service

conception rate and late embryonic/foetal mortality in low fertility dairy herds. *Anim Reprod Sci.* 91(1-2): 31-44.

**178. GRÔHN, Y., ERB, H., MC CULLOCH, CH. And SALONIEMI, H.** (1990) Epidemiology of reproductive disorders in dairy cattle: associations among host characteristics, disease and production. *Prev Vet. Med.* 8: 25-39.

**179. GROOMS, D.L. and KEILEN, ED.** (2002) Screening of neonatal calves for persistent infection with Bovine Diarrhea Virus by immunohistochemistry on skin biopsy samples. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9: 898-900.

**180. GROOMS DL.** (2004) Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. N. Am. Food. Anim. Pract.* 21(2): 5-19.

**181. GUY, C.S., WILLIAMS, D.J.L., KELLY, D.F., McGARRY, J.W., GUY, F., BJÖRKMAN, C., SMITH, R.F. and TREES, A.J.** (2001) *Neospora caninum* in persistently infected, pregnant cows: spontaneous transplacental infection in associated with acute increase in maternal antibody. *Vet. Rec.* 149: 443-449.

**182. HAINES DM, CHELACK BJ.** (1991) Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues for diagnostic pathology. *J Vet Diagn Invest.* 3: 101-112.

**183. HALE, A.D., GREEN, J. and BROWN, D.W.G.** (1996) Comparison of four extraction methods for the detection of small round structured viruses in faecal specimens. *J. Virol. Methods.* 57: 195-201.

**184. HALL, M.R., HANKS, D., KVASNICKA, W., BOSOMWORTH, A., SMITH, H., STOTT, J.L., BLANCHARD, M.T. and ANDERSON, M.L.** (2002) Diagnosis of epizootic bovine abortion in Nevada and identification of the vector. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14: 205- 210.

**185. HANSEN, P.J.** (1997) Interactions between the immune system and the bovine conceptus. *Theriogenology.* 47: 121-130.

**186. HARRIS, F.W. and JANZEN, E.D.** (1989) The *Haemophilus somnus* disease complex (Hemophilosis): A review. *Can. Vet. J.* 30: 816-820.

**187. HASSAN, L., MOHAMED, H., MCDONOUGH, O. and GONZÁLEZ, R.** (2000) A Cross-sectional study on the prevalence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in New York Dairy herds. *J. Dairy Sci.* 83: 2441-2447.

**188. HAYES, D.C., ANDERSON, R.R. and WALKER, R.L.** (2003) Identification of trichomonadid protozoa from the bovine preputial cavity by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism typing. *J. Vet. Invest.* 15: 390-394.

- 189. HEALTH, S.E., JOHNSON, R.** (1994) Leptospirosis. *J.A.V.M.A.* 205: 1518-1523.
- 190. HER, M., CHO, D.H., KANG, S., CHO, Y.S., HWANG, I.Y., BAE, Y.C., YOON, H., HEO, Y.R., JUNG, S.C. and YOO, H.S.** (2010) The development of a selective medium for the *Brucella abortus* strains and its comparison with the currently recommended and used medium. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 67: 15-21.
- 191. HILL, J.A., POLGAR, K. and ANDERSON, D.J.** (1995) T-helper 1-type immunity to trophoblast in women with recurrent spontaneous abortion. *J. Am. Med. Assoc.* 273: 1933-1936.
- 192. HILL, M.W., WHITEMAN, C.E., BENJAMIN, M.M. and BALL, L.** (1971) Pathogenesis of experimental bovine mycotic placentitis produced by *Aspergillus fumigatus*. *Vet. Pathol.* 8(2): 175-192.
- 193. HINTON, M.** (1977) The diagnosis of Salmonella abortion in cattle with particular reference to Salmonella Dublin. A review. *J Hyg.* 79: 25-38.
- 194. HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A., STALEY, J.T., WILLIAMS, S.T.** (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth Ed Williams and Wilkins. Baltimore, USA.
- 195. HONG, C.B., GILES Jr., R.C., NEWMAN, L.E. and FAYER, R.** (1982) Sarcocystosis in an aborted bovine fetus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 181: 585-588.
- 196. HONG, C.B., DONAHUE, J.M., GILES Jr., R.C., OONACHA, K.B., TUTTLE, P.A. and CHEVILLE, N.F.** (1991) *Brucella abortus*-associated meningitis in aborted bovine fetuses. *Vet. Pathol.* 28(6): 492-496.
- 197. HORNSBY, R.L., JENSEN, A.E., OLSEN, S.C. and THOEN, C.O.** (2000) Selective media for isolation of *Brucella abortus* strain RB51. *Vet. Microbiol.* 73: 51-60.
- 198. HUBBERT, W.T., BOOTH, G.D., BOLTON, W.D., DUNNE, H.W., McENTEE, K., SMITH, R.E. and TOURTELLOTTE, M.E.** (1973) Bovine abortions in five Northeastern states, 1960-1970: Evaluation of diagnostic laboratory data. *Cornell Vet.* 63: 291-316.
- 199. HUM S.** (1987) Bovine abortion due to *Campylobacter fetus*. *Aust Vet J.* 64(10): 319-20.
- 200. HUM, S., QUINN, K., BRUNNER, J. and ON, S.L.W.** (1997) Evaluation of a PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. *Aust. Vet. J.* 75: 827-830.

- 201. HYNDMAN, L., VILCEK, S., CONNER, J and NETTLETON.** (1998) A novel nested reverse transcription PCR detects bovine viral diarrhoea virus in fluids from aborted bovine fetuses. *J. Virol. Methods.* 71: 69-76.
- 202. INNES, E.A., WRIGHT, S., MALEY, S., RAE, A., SCHOCK, A., KIRVAR, E., BARTLEY, P., HAMILTON, C., CAREY, I.M. and BUXTON, D.** (2001) Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *Int. J.Parasitol.* 31:1523-1534.
- 203. INNES, E.A., ANDRIANARIVO, A.G., BJÖRKMAN, C., WILLIAMS, D.J.L. and CONRAD, P.A.** (2002) Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends Parasitol.* 18: 497-504.
- 204. INTA** (2000). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Documento del Programa de Salud Animal. Mimeo, 85, pp.
- 205. JAMALUDDIN, A.A., CASE, J.T., HIRD, D.W., BLANCHARD, P.C., PEAUROI, J.R. and ANDERSON, M.L.** (1996) Dairy cattle abortion in California: evaluation of diagnostic laboratory data. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8: 210-218.
- 206. JENKINS, M., BASZLER, T., BJÖRKMAN, C., SCHARES, G. and WILLIAMS, D.** (2002) Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *Int. J. Parasitol.* 32: 631-636.
- 207. JERRET IV, McORIST S, WADDINGTON J, BROWNING JW, MALECKI JC, McCAUSLAND IP.** (1984) Diagnostic studies of the fetus, placenta and maternal blood from 265 bovine abortions. *Cornell Vet.* 74: 8-20.
- 208. JONKER, F.H.** (2004) Fetal death: comparative aspects in large domestic animals. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83: 415-430.
- 209. JOHNSON, C.T., LUPSON, G.R. and LAWRENCE KE.** (1994) The bovine placentome in bacterial and mycotic abortions. *Vet. Rec.*134: 263-266.
- 210. JONES, C.; GEISER, V.; HENDERSON, G.; JIANG, Y.; MEYER, F.; PÈREZ, S. y ZHANG, Y.** (2006). Functional analysis bovine herpesvirus 1 (BHV-1) genes expressed during latency. *Vet. Microbiol.* 113 (3-4): 199-210.
- 211. JOUGLARD, S.D.D., SIMIONATTO, S., SEIXAS, F.K., NASSI, F.L. and DELLAGOSTIN, O.A.** (2006). Nested polymerase chain reaction for detection of pathogenic leptospire. *Canadian Journal of Microbiology.* 52(8): 747-752.
- 212. JUBB, K.V.F, KENNEDY, P.C. and PALMER, N:** Miscellaneous bacterial infection causing abortion in cattle. In Jubb KVF, Kennedy, PC, Palmer N (eds):

*Pathology of Domestic Animals*, 3<sup>rd</sup> ed, Vol III, p 357. New York: Academic Press Inc, 1985.

**213. JUBB, K.V.F, KENNEDY, P.C. and PALMER, N.** Pathology of Domestic Animals. 5<sup>th</sup> edition. (ed): M. Grant Maxie. New York: Academic Press, Inc, 2007.

**214. KENDRICK JW.** (1971) Bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus infection in pregnant cows. *Am. J. Vet. Res.* 32(4): 533-44.

**215. KENDRICK JW.** (1973) Effects of the infectious bovine rhinotracheitis virus on the fetus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 163: 852.

**216. KENNEDY, J.A., MORTIMER, R.G. and POWERS, B.** (2006) Reverse transcription-polymerase chain reaction on pooled samples to detect bovine viral diarrhoea virus by using fresh ear-notch-sample supernatants. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18(1): 89-93.

**217. KENNEDY, P.C., OLANDER, H.J. and HOWARTH, J.A.** (1960) Pathology of epizootic bovine abortion. *Cornell Vet.* 50: 417-429.

**218. KENNEDY, P.C. and RICHARDS, W.P.C.** (1964) The pathology of abortion caused by the virus of infectious bovine rhinotracheitis. *Vet. Pathol.* 1: 7-17.

**219. KENNEDY PC, CASARO AP, KIMSEY PB, et al.** (1983) Epizootic bovine abortion: histogenesis of the fetal lesions. *Am. J. Vet. Res.* 44: 1040-1048.

**220. KENNEDY, P.C and MILLER, R.B.** Pathology of Domestic Animals. Volume III. 4<sup>th</sup> edition, 1992, pp. 405, eds K.V.F. Jubb, P.C. Kennedy and N. Palmer. London: Academic Press.

**221. KHODAKARAM-TAFTI, A. and IKEDE, B.O.** (2005) A retrospective study of sporadic bovine abortions, stillbirths, and neonatal abnormalities in Atlantic Canada, from 1990 to 2001. *Can. Vet. J.* 46: 635-637.

**222. KIM, J.H., LEE, J.K., LEE, B.C., PARK, B.K., YOO, H.S., HWANG, W.S., SHIN, N.R., KANG, M.S., JEAN, Y.H., YOON, H.J., KANG, S.K. and KIM, D.Y.** (2002) Diagnostic survey of bovine abortion in Korea: with special emphasis on *Neospora caninum*. *J. Vet. Med. Sci.* 64: 1123-1127.

**223. KIMSEY, P.B, KENNEDY, P., BUSHNELL, R., CASARO, A., BON DURANT, R., OLIVER, M, KENDRICK, J.** (1983) Studies on the pathogenesis of epizootic bovine abortion. *Am. J. Vet. Res.* 44: 1266-1271.

**224. KING, D.P., CHEN, C., BLANCHARD, M.T., ALDRIDGE, B.M., ANDERSON, M., WALKER, R., MASS, J., HANKS, D, HALL, M. and STOTT,**

- J.L.** (2005) Molecular identification of a novel deltaproteobacterium as the etiologic agent of epizootic bovine abortion (foothill abortion). *J. Clin. Microbiol.* 43: 604-609.
- 225. KING, J.S., SLAPETA, J., JENKINGS, D.J., AL-QASSAB, S.E., ELLIS, J.T. and WINDSOR, P.A.** (2010) Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* Article in Press.
- 226. KIRK, J.H.** (2003) Infectious abortions in dairy cows
- 227. KIRKBRIDE, C.A., BICKNELL, E.J., REED, D.E., ROBL, M.G., KNUDTSON, W.V., WOHGEMEUTH, K.** (1973) A diagnostic survey of bovine abortion and stillbirth in the Northern Plains States. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 162: 556-560.
- 228. KIRKBRIDE, C.A., MARTINOVICH, D. and WOODHOUSE DA.** (1977) Immunoglobulins and lesions in aborted bovine fetuses. *N. Z. Vet. J.* 25:180-187.
- 229. KIRKBRIDE, C.A.** (1985) Managing an outbreak of live-stock abortion-1: help from the laboratory. *Vet. Med.* 80: 113-115.
- 230. KIRKBRIDE, C.A.** (1985) Managing an outbreak of livestock abortion-2: diagnosis and control of bovine abortion. *Vet. Med.* 80: 70-79.
- 231. KIRKBRIDE, C.A.** (1986) Examination of bovine and ovine fetuses. *Vet. Clin. N. Am. Food. Anim. Pract.* 2: 61-83.
- 232. KIRKBRIDE, C.A. and JOHNSON M.W.** (1989) Serologic examination of aborted ovine and bovine fetal fluids for the diagnosis of border disease, bluetongue, bovine viral diarrhoea, and leptospiral infections. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1: 132-138.
- 233. KIRKBRIDE, C.A.** (1991) Causes and prevention of bovine abortion. *Bovine Proceedings.* 23: 75-80.
- 234. KIRKBRIDE, C.A.** (1992) Etiologic agents detected in a 10-year study of bovine abortions and stillbirths. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4: 175-180.
- 235. KIRKBRIDE, C.A.** (1992) Viral agents and associated lesions detected in a 10-year study of bovine abortions and stillbirths. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4: 374-379.
- 236. KIRKBRIDE, C.A.** (1993) Bacterial agents detected in a 10-year study of bovine abortions and stillbirths. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5: 64-68.
- 237. KNUDTSON WU, KIRKBRIDE, CA.** (1992) Fungi associated with bovine abortion in the northern plains states (USA). *J. Vet. Diagn. Invest.* 4(2): 181-185.
- 238 GUTIERREZ, C.A., SANO, T., OMATA, Y., CRUZ, L.C., ONUMA, M. and OHASHI, K. KONNAI, S., MINGALA, C.N., SATO, M., ABES, N.S., VENTURINA, F.A.** (2008). A survey of abortifacient infectious agents in livestock in

Luzon, the Philippines, with emphasis on the situation in a cattleherd with abortion problems. *Acta Tropica* 105: 269–273.

**239. KULKARNI SP, LEVER S, LOGAN JM, LAWSON AJ, STANLEY J, SHAFI MS.** (2002) Detection of campylobacter species: a comparison of culture and polymerase chain reaction based methods. *J. Clin. Pathol.* 55(10): 749-753.

**240. LAAMANEN, U.I., NEUVONEN, E.P., YLIVIUHKOLA, E.M. and VEIJALAINEN, P. M.-L.** (1997) Comparison of RT-PCR assay and virus isolation in cell cultures for the detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in field samples. *Res. Vet. Sci.* 63: 199-203.

**241. LANGONI, H., de SOUZA, L.C., da SILVA, A.V., LUVIZOTTO, M.C., PAES, A.C. and LUCHEIS, S.B.** (1999) Incidence of leptospiral abortion in Brazilian dairy cattle. *Prev. Vet. Med.* 40: 271-275.

**242. LARSON, B.L.** (1996). Diagnosing the cause of bovine abortions and other perinatal deaths, food animal practice, finding the cause of bovine perinatal death. *Vet Med.* 91: 478-486.

**243. LEAL-KLEVEZAS, D.S., MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, I.O., LÓPEZ-MERINO, A. and MARTÍNEZ-SORIANO, J.P.** (1995b) Single step PCR for detection of *Brucella spp.* From blood and milk of infected animals. *J. Clin. Microbiol.* 33: 3087-3090.

**244. LEAL-KLEVEZAS, D.S., MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, I.O., GARCÍA-CANTÚ, J., LÓPEZ-MERINO, A. and MARTÍNEZ-SORIANO, J.P.** (2000) Use of polymerase chain reaction to detect *Brucella abortus* biovar 1 in infected goats. *Vet. Microbiol.* 75: 91-97.

**245. LEARY, S.O., SHEAHAN, M. and TORRES, S.** (2006) *Brucella abortus* detection by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows. *Res. Vet. Sci.* 81(2): 170-176.

**246. LEATHEM, A.J.C:** Lectin Histochemistry. Modern Methods and Applications, 2<sup>nd</sup> Ed., pp. 167-87, eds. J.M. Polak and S. Van Nordem. Bristol: Wrigth and Sons., 1986.

**247. LEE, B.Y., HIGGINS, I.M., MOON, O.K., CLEGG, T.A., McGRATH, G., COLLINS, D.M., PARK, J.Y., YOON, H.C., LEE, S.J. and MORE, S.J.** (2009) Surveillance and control of bovine brucellosis in the Republic of Korea during 2000-2006. *Prev. Vet. Med.* 90: 66-79.

- 248. LEIPOLD, H.W.** (1982) Congenital Defects of Current Concern and Interest in Cattle: A review. *Bov. Pract.* 17: 101-114.
- 249. LEONARD, F.C.** (1995) Leptospirosis in cattle. An update. *I.Vet. J.* 48: 46-50.
- 250. LEVETT, P.N.** (2001) Leptospirosis. *C.Microbiol. Rev.* 14: 296-326.
- 251. LEVINE, N.D.** (1973). Protozoan Parasites of Domestic Animals and man. Chapter 5. 2<sup>nd</sup> edition, pp. 88, eds Burgess Publishing Company. Minnesota.
- 252. LEYLA, G., KADRI, G. and UMRAN, O.** (2003) Comparison of polymerase chain reaction and bacteriological culture for the diagnosis of sheep brucellosis using aborted fetus samples. *Vet. Microbiol.* 93: 53-61.
- 253. LILENBAUM, W., VARGES, R., BRANDAO, F.Z., CORTEZ, A., de SOUZA, S.O., BRANDAO, P.E., RICHTZENHAIN, L.J. and VASCONCELLOS, S.A.** (2008) Detection of *Leptospira spp.* in semen and vaginal fluids of goats and sheep by polymerase chain reaction. *Theriogenology.* 69(7): 837-842.
- 254. LINDSAY DS, DUBEY JP.** (1989) Immunohistochemical diagnosis of *Neopora caninum* in tissue sections. *Am. J. Vet. Res.* 50(11): 1981-1983.
- 255. LOEFFLER, D., KALMAR, E., ABRAHAM, A., DOLJANSKY, N. and TRAININ, Z.** (1984) Bovine abortion in Israel 1977-1978: pathological, bacteriological and virological evaluation of foetuses. *Refuah Veterinarith.* 41: 127-133.
- 256. LONGBOTTOM, D. and COULTER, L.J.** (2003) Animal chlamydioses and zoonotic implications. *J. Comp. Pathol.* 128: 217- 244.
- 257. LOPES, C.W., de Sa., W.F. and BOTELHO, G.G.** (2005) Lesion in cross-breed pregnant cows, experimentally infected with *Sarcocystis cruzi* (Hasselmann, 1923) Wenyon, 1926 (Apicomplexa: Sarcocystidae). *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 14: 79-83.
- 258. LOPEZ, A., PEREZ, A. and ANGULO, G.** (1989) Distribution of lesions in the lungs of aborted bovine fetuses. *Can. Vet. J.* 30: 519-521.
- 259. LOPEZ, A. and BILDFELL, R.** (1992) Pulmonary inflammation associated with aspirated meconium and epithelial cells in calves. *Vet. Pathol.* 29: 104-111.
- 260. LOPEZ, A., HITOS, F., PEREZ, A. and NAVARRO-FIERRO, R.R.** (1984) Lung lesions in bovine fetuses aborted by *Brucella abortus*. *Can. J. Comp. Med.* 48: 275-277.
- 261. LÓPEZ-GATIUS, F., SANTOLARÍA, J., YANIZ, J., RUTLLANT, J., LÓPEZ-BÉJAR, M.** (2002) Factors affecting pregnancy loss from gestation day 38 to 90 in lactating dairy cows from a single herd. *Theriogenology.* 57: 1251-1261.

- 262. LOW, J.C. and DONACHIE, W.** (1997) A Review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis. *Vet. J.* 153: 9-29.
- 263. MACALDOWIE, C., MALEY, S.W., WRIGHT, S., BARTLEY, P., ESTEBAN-REDONDO, I., BUXTON, D. and INNES, E.A.** (2004) Placental Pathology Associated with Fetal Death in Cattle Inoculated with *Neospora caninum* by Two Different Routes in Early Pregnancy. *J. Comp. Path.* 131: 142-156.
- 264. MALEY, S.W., BUXTON, D., RAE, A.G., WRIGHT, S.E., SCHOCK, A., BARTLEY, P.M., ESTEBAN-REDONDO, I., SWALES, C., HAMILTON, C.M., SALES, J. and INNES, E.A.** (2003) The pathogenesis of neosporosis in pregnant cattle: inoculation at mid-gestation. *J. Comp. Path.* 129: 186-195.
- 265. MALEY, S.W., BUXTON, D., MACALDOWIE, C.N., ANDERSON, I.E., WRIGHT, S.E., BARTLEY, P.M., ESTEBAN-REDONDO, I., HAMILTON, C.M., STORSE, A.K. and INNES, E.A.** (2006) Characterization of the immune response in the placenta of cattle experimentally infected with *Neospora caninum* in early gestation. *J. Comp. Path.* 135: 130-141.
- 266. MARDONES, F.O., PEREZ, A.M., MARTÍNEZ, A. and CARPENTER, T.E.** (2008) Risk factors associated with *Tritrichomonas foetus* infection in beef herds in the Province of Buenos Aires, Argentina. *Vet. Parasitol.* 153: 231-237.
- 267. MAYER-SCHOLL, A., DRAEGER, A., GÖLLNER, C., SCHOLZ, H.C. and NÖCKLER, K.** (2010) Advancement of a multiplex PCR for the differentiation of all currently described *Brucella* species. *J. Microbiol. Meth.* 80: 112-114.
- 268. McALLISTER, D. and LATHAM, S.** (2002) *Neospora* 2001. *TRENDS in Parasitol.* 18: 4-5.
- 269. McALLISTER, M.M., DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S., JOLLEY, W.R., WILLS, R.A. and McGUIRE, A.M.** (1998) Dogs are definitive host of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 28: 1473-1478.
- 270. McCLAUSLAND IP, SLEE KJ, HIRST FS.** (1987) Mycotic abortion in cattle. *Aust. Vet. J.* 64(6): 129-132.
- 271. McDERMOTT, J.J. and ARIMI, S.M.** (2002) Brucellosis in sub-Saharan Africa: epidemiology, control and impact. *Vet. Microbiol.* 90: 11-134.
- 272. McGOWAN, M.R. and KIRKLAND, D.** (1995) Early reproductive loss due to Bovine Pestivirus Infection. *Br. Vet. J.* 151: 263-270.
- 273. MEADOR VP, TABATABAI LB, HAGEMOSER WA, DEYOE BL.** (1986) Identification of *Brucella abortus* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of cows,

goats, and mice with an avidin-biotin-peroxidase complex immunoenzymatic staining technique. *Am J Vet Res.* 47(10): 2147-2150.

**274. MEADOR, V.P, HAGEMOSER WA, DEYOE BL.** (1988) Histopathologic findings in *Brucella abortus*-infected, pregnant goats. *Am J Vet Res.* 49(2): 274-280.

**275. MEDINA L, CRUZ-VAZQUEZ C, QUEZADA T, MORALES E, GARCIA-VAZQUEZ Z.** (2006) Survey of *Neospora caninum* infection by nested PCR in aborted fetuses from dairy farms in Aguascalientes, Mexico. *Vet Parasitol.* 136(3-4): 187-91.

**276. MELLICK, P.W.** (1964) Diagnosis of *Vibrio fetus* infection in the bull by use of fluorescent antibody technique. Thesis. New York State. Veterinary College. Ithaca.

**277. MÉRIEN, F., AMOURIAUX, P., PEROLAT, P., BARANTON, G. and SAINT GIRONS, I.** (1992) Polymerase Chain Reaction for Detection of *Leptospira* spp in Clinical Samples. *J. Clin. Microbiol.* 30: 2219-2224.

**278. MICKELSEN, W.D. and EVERMANN, J.F.** (1994) In utero infections responsible for abortion, stillbirth, and birth of weak calves in beef cows. *Vet. Clin. N. Am. Food. Anim. Pract.* 10: 1-14.

**279. MILLER DA, WILSON MA, KIRKBRIDE CA.** (1989) Evaluation of multivalent *Leptospira* fluorescent antibody conjugates for general diagnostic use. *J Vet Diagn Invest.* 1(2): 146-149.

**280. MILLER, J.M and VAN DER MAATEN** (1989) Demonstration of infectious bovine rhinotracheitis virus antigen in paraffin sections. *J Vet Diagn Invest.* 1: 105-109.

**281. MILLER, R.B. and QUINN, P.J.** (1975) Observations on Abortions in Cattle: A Comparison of Pathological, Microbiological and Immunological Findings in Aborted Foetuses and Foetuses Collected at Abattoirs. *Can. J. Comp. Med.* 39: 270-290.

**282. MILLER, R.B.** (1977). A summary of some of the pathogenetic mechanisms involved in bovine abortion. *Can. Vet. J.* 18: 87-95.

**283. MILLER, R.B.** (1982) A Discussion on Reproductive failure in Cattle. *Bov. Pract.* 17: 39-51.

**284. MILLER, R.B.** (1986) Bovine abortion. *Current Therapy.* 21: 291-297.

**285. MILLER RB.** Diagnosing the infectious causes of bovine abortion. In *Proceedings of the Society for Theriogenology*, Toronto, Ontario, Canada, 1990, pp 4-8

**286. MILLER, R.B, CHELMONSKA-SOYTA, A. SMITS, B, et al.** (1994) *Ureaplasma diversum* as a cause of reproductive disease in cattle. *Vet. Clin. N. Am. Food. Anim. Pract.* 10: 479-490

- 287. MITCHELL, G. and BARTON, M.G.** (1986) Bovine abortion associated with *Bacillus licheniformis*. Aust. Vet. J. 63 (5): 160-161.
- 288. MOENNIG, V. and LIESS, B.** (1995) Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhoea virus. Vet. Clin. N. Am. Food. Anim. Pract. 11: 477-487.
- 289. MOLELLO, J.A., CHOW, T.L., OWEN, N. and JENSEN, R.** (1966) Placental Pathology. V. Placental lesions of cattle experimentally infected with Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus. Am.J.Vet.Res. 27 (119): 907-915.
- 290. MOORE, S., GUNN, M. and WALLS, D.** (2000) A rapid and sensitive PCR based diagnostic assay to detect bovine herpesvirus 1 in routine diagnostic submissions. Vet. Microbiol. 75: 145-153.
- 291. MOORE, D.P., CAMPERO, C.M., ODEÓN, A.C., POSSO, M.A., CANO, D., LEUNDA, M.R., BASSO, W., VENTURINI, M.C. and SPÄTH, E.** (2002) Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. Veterinary Parasitology.107: 303-316.
- 292. MOORE, D.P., CAMPERO, C.M., ODEON, A.C., BARDON, J.C., SILVA-PAULO, P., PAOLICCHI, F.A. and CIPOLLA, A.L.** (2003) Humoral immune response to infectious agents in aborted bovine fetuses in Argentina. Rev. Arg. Microbiol. 35: 143-148.
- 293. MOORE, D.P., ODEON, A.C., VENTURINI, M.C. and CAMPERO, C.M.** (2005) Neosporosis bovina: conceptos generales, inmunidad y perspectivas para la vacunación. Rev. Arg. Microbiol. 37: 217-228.
- 294. MOORE, D.P., REGIDOR-CERRILLO, J., MORRELL, E., POSO, M.A., CANO, D.B., LEUNDA, M.R., LINSCHINKY, L., ODEÓN, A.C., ODRIÓZOLA, E., ORTEGA-MORA, L.M., CAMPERO, C.M.** (2008) The role of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in spontaneous bovine abortion in Argentina. Vet. Parasitol. 156: 163-167.
- 295. MORÈ, G., BACIGALUPE, D., BASSO, W., RAMBEAUD, M., BELTRAME, F., RAMIREZ, B., VENTURINI, M.C. and VENTURINI, L.** (2009) Frequency of horizontal and vertical transmission for *Sarcocystis cruzi* and *Neospora caninum* in dairy cattle. Vet. Parasitol. 160: 51-54.
- 296. MORRELL, E.L., POSO, MA, CAMPERO, CM.** (2005) Empleo de la técnica de avidina biotina peroxidasa en el diagnóstico del aborto bovino (poster). 12th International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, November 16-19.. Montevideo, Uruguay

- 297. MORRELL, E.L.; BOHN, K.A., POSO, M.A. and CAMPERO, C.M.** (2006) Utilización de técnicas diagnósticas para la identificación de *Leptospira spp.* en tejidos fetales bovinos. Vet. Arg. 225(23): 333-342.
- 298. MUKHUFHI, N., IRONS, P.C., MICHEL, A. and PETA, F.** (2003) Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Tritrichomonas foetus* infection in bulls: effects of sample collection method, storage and transport medium on the test. Theriogenology. 60: 1269-1278.
- 299. MUÑOZ, D.P., LAGER, I.A., MERSICH, S., ZABAL, O., ULLOAS, E., SCHUDEL, A.A. and WEBER, E.L.** (1996) Foetal infections with bovine viral diarrhoea virus in Argentina. Br. Vet. J. 152: 175-182.
- 300. MUÑOZ-ZANZI, C.A., JOHNSON, W.O., THURMOND, M.C. and HIETALA, S.K.** (2000). Pooled-sample testing as a herd-screening tool for detection of bovine viral diarrhoea virus persistently infected cattle. J. Vet. Diagn. Invest. 12 (3): 195-203.
- 301. MUÑOZ-ZANZI, C., HIETALA, S., THURMOND, M. and JOHNSON, O.** (2003) Quantification, risk factors, and health impact of natural congenital infection with bovine viral diarrhoea virus in dairy calves. A. J. Vet. Res. 64: 358-365.
- 302. MURRAY RD.** (1991) Lesions in aborted bovine fetuses and placenta associated with bovine viral diarrhoea virus infection. Archives of virology. 3: 217-224.
- 303. MURRAY, R.D.** (2006) Practical Approach To Infectious Bovine Abortion Diagnosis. XXIV World Buiatrics Congress, Nice, France.
- 304. MUTTO, A.A., GIAMBIAGGI, S. and ANGEL, S.O.** (2006) PCR detection of *Tritrichomonas foetus* in preputial bull fluid without prior DNA isolation. Vet. Parasitol. 136: 357-361.
- 305. NABEYA, M., KANEKO, M., OGINO, K., NAKABAYASHI, H., WATANABE, D., MURAYAMA, T., HAYASHI, J., FUKUSHI, K., YAMAGUCHI, H., HIRAI, T., INABA, K., and MATUMOTO, M.** (1991). Abortion in Japanese cows caused by *Chlamydia psittaci*. Vet. Microbiol. 29: 261-265
- 306. NETTLETON, P.F. and ENTRINCAN, G.** (1995) Ruminant pestiviruses. Br. Vet. J. 151: 615-642.
- 307. NICKEL, D.D., OLSON, M.E. and SCHULTZ, G.A.** (2002) An improved polymerase chain reaction assay for the detection of *Tritrichomonas foetus* in cattle. Can. Vet. J. 43: 213-216.

- 308. NIELSEN, K.H. and DUNCAN, J.R.** (1990) Animal Brucellosis. CRC. Press, Boca Raton FL, 453 pp.
- 309. NIELSEN, K.H., KELLY, L., GALL, D., NICOLETTI, P. and KELLY, W.** (1995) Improved competitive enzyme immunoassay for the diagnosis of bovine brucellosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 46: 285-291.
- 310. NIELSEN, K.H., KELLY, L., GALL, D., BALSELVICIUS, S., BOSSE, J., NICOLETTI, P. and KELLY, W.** (1996) Comparison of enzyme immunoassays for the diagnosis of bovine brucellosis. *Prev. Vet. Med.* 26: 17-32.
- 311. NICOLETTI, P.** (1980) The epidemiology of Bovine Brucellosis. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 24: 69-98.
- 312. NICOLETTI, P.** (1990) Bovine abortion caused by *Brucella sp.* In Kirkbride CA (ed): *Laboratory Diagnosis of Livestock Abortion*, 3<sup>rd</sup> ed, p 22. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 1990.
- 313. NORTON, J.H. and CAMPBELL, R.S.** (1990) Non-infectious causes of bovine abortion. *Vet. Bull.* 60(12): 1137-1147.
- 314. OCHOLI, R.A., KWAGA, J.K.P., AJOGI, I. and BALE, J.O.O.** (2004) Phenotypic characterization of *Brucella* strains isolated from livestock in Nigeria. *Vet. Microbiol.* 103: 47-53.
- 315. ODEON AC, SPATH EJA, PALOMA EJ, LEUNDA MR, FERNANDEZ-SAINZ IJ, PEREZ SE, KAISER GG, DRAGHI MG, CETRA BM, CANO A.** (2001) Prevalencia de anticuerpos al virus de la Diarrea Viral Bovina, Herpesvirus bovino y Virus Sincicial Respiratorio bovino en Argentina. *Rev. Med. Vet.* 82: 216-220.
- 316. ODEÓN, A.C., LEUNDA, M.R., MOORE, D.P., CAMPERO, C.M.** (2003) Anticuerpos contra los virus de la Diarrea Viral Bovina y Herpesvirus bovino en fetos abortados. Sociedad Argentina de Virología XXIII Reunión Científica Anual Tandil, Buenos Aires 1 al 3 de Diciembre.
- 317. OGINO, H., INUI, S., NARITA, M.** (1996) Demonstration of infectious bovine rhinotracheitis virus antigen by immunoperoxidase method in tissues of aborted bovine fetuses preserved for 25 years in paraffin blocks. *J. Vet. Med. Sci.* 58(5): 459-460.
- 318. OIE.** (2008) Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres. Disponible en URL:  
[http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/e\\_summry.htm](http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/e_summry.htm)
- 319. ON, S.** (1996) Identification methods for *Campylobacters*, *Helicobacters* and related organisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 9: 405-422.

- 320. ORTEGA-MORA, L.M.** (2006) Comparison of *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions between epidemic and endemic bovine abortion cases. *Vet. Parasitol.* 142: 187-191.
- 321. OSBURN, B.I.** (1973) Immune Responsiveness of the Fetus and Neonate. *J.A.V.M.A.* 163: 801-803.
- 322. OSBURN, B.I. and KENNEDY, P.C.** (1981) Abortion and prenatal disease. *Current Veterinary Therapy 1. Food Animal.* Published by W. B. Saunders, Philadelphia, USA. 997-1000.
- 323. OSBURN BI, MACLACHLAN NJ, TERRELL TG.** (1982) Ontogeny of the immune system. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 181(10): 1049-1052.
- 324. PADILLA, C., MONTOYA, I. and CARILLO, C.** (2003) Estandarización de una prueba de PCR para la detección de *Brucella sp.* *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública.* 20: 102-104.
- 325. PADILLA POESTER, F., PICA O GONCALVES, V.S. and PEREIRA LAGE, A.** (2002) Brucellosis in Brazil. *Vet. Microbiol.* 90: 55-62
- 326. PALMER, M.V., CHEVILLE, N.F. and JENSEN, A.E.** (1996) Experimental infection of pregnant cattle with the vaccine candidate *Brucella abortus* RB51: pathologic, bacteriologic, and serologic findings. *Vet. Pathol.* 33: 682-691.
- 327. PANANGALA, V.S., HALL, C.E., CAVENEY, N.T., LEIN, D.H. and WINTER, A.J.** (1982) *Mycoplasma Bovigenitalium* in the upper genital tract of bulls: spontaneous and induced infections. *Cornell Vet.* 72: 292-303.
- 328. PARÉ, J., THURMOND, M.C. and HIETALA, S.** (1996) Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhood mortality. *Can. J. Vet. Res.* 60: 133-139.
- 329. PARÉ, J., FECTEAU, G., FORTIN, M. and MARSOLAIS, G.** (1998) Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. *JAVMA.* 213: 1595-1598.
- 330. PEREIRA-BUENO, J., QUINTANILLA-GOZALO, A., PEREZ-PEREZ, V., ESPI-FELGUEROSO, A., ALVAREZ-GARCIA, G., COLLANTES-FERNANDEZ, E. and ORTEGA-MORA, L.M.** (2003) Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. *Vet. Parasitol.* 111: 143-152.
- 331. PEREIRA-BUENO, J., QUINTANILLA-GOZALO, A., PEREZ-PEREZ, V., ALVAREZ-GARCIA, G., COLLANTES-FERNANDEZ, E. and ORTEGA-**

- MORA, L.M.** (2004). Evaluation of ovine abortion associated with *Toxoplasma gondii* in Spain by different diagnostic techniques. *Vet. Parasitol.* 121: 33-43.
- 332. PEREZ-MARTINEZ, J.A. and STORZ, J.** (1985) Chlamydial infections in cattle-part 2. *Mod. Vet. Pract.* 603-608.
- 333. PEREZ, J., QUEZADA, M., LOPEZ, J., CASQUET, O., SIERRA, M.A. and MARTIN DE LAS MULAS, J.** (1998) Immunohistochemical detection of *Brucella abortus* antigens in tissues from aborted bovine fetuses using a commercially available polyclonal antibody. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10(1): 17-21.
- 334. PÉREZ, S.; INMAN, M. y DOSTER, A.** (2005): Latency-related gene encoded by bovine herpesvirus 1 promotes virus growth and reactivation from latency in tonsils of infected calves. *J. Clin. Microbiol.* 43(1): 393-401.
- 335. PESCADOR, C.A., CORBELLINI, L.G., OLIVEIRA, E.C., RAYMUNDO, D.L., DRIEMEIER, D.** (2007) Histopathological and immunohistochemical aspects of *Neospora caninum* diagnosis in bovine aborted fetuses. *Vet. Parasitol.* 150: 159-163.
- 336. PHILPOTT, M.** (1968) Diagnosis of *Vibrio fetus* infection in the bull. *Vet. Rec.* 82: 458-463.
- 337. PINTO, G.B., HAWKES, P. and ZABAL, O.** (1993) Viral antibodies in bovine fetuses in Argentina. *Res. Vet. Sci.* 55: 385-388.
- 338. POWELL, H.A., GOODING, C.M., GARRET, S.D., LUND, B.M. and McKEE, R.A.** (1994) Proteinase inhibition of the detection of *Listeria monocytogenes* in milk using the polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* 18: 59-61.
- 339. QUARESMA-BOMFIM, M.R., BARBOSA-STANCIOLI, E.F. and KOURY, M.C.** (2007) Detection of pathogenic leptospire in urine from naturally infected cattle by nested PCR. *Vet. J.* 178(2): 251-256.
- 340. RAGHUPATHY, R.** (1997) Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol. Today.* 18: 478-482.
- 341. RAMOS-VARA, J.A, DEL PIERO, F., KIUPEL, M., FITZGERALD, S.D., BERMUDEZ, A.J., JOHNSON, G.C., MILLER, M.A.** (2002<sup>a</sup>) Diagnostic immunohistochemistry of equine and avian infectious diseases. *J. Histotechnol.* 25: 185-198.
- 342. RAMOS-VARA, J.A, KIUPEL, MILLER, M.A.** (2002<sup>b</sup>) Diagnostic immunohistochemistry of infectious diseases in dogs and cats. *J. Histotechnol.* 25: 201-212.

- 343. REARTE, D.** 2010. Perspectivas de la producción de Carne Vacuna. Disponible en URL: [www.inta.gov.ar/balcarce/carnes](http://www.inta.gov.ar/balcarce/carnes)
- 344. REITT, K., HILBE, M., VOEGTLIN, A., CORBOZ, L., HAESSIG, M. and POSPISCHIL, A.** (2007) Aetiology of Bovine Abortion in Switzerland from 1986 to 1995- A retrospective Study with Emphasis on Detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* by PCR. J. Vet. Med. A. 54: 15-22.
- 345. RENUKARADHYA, G.J., ISLOOR, S., RAJSEKHAR, M.** (2002) Epidemiology, zoonotic aspects, vaccination and control/eradication of brucellosis in India. Vet. Microbiol. 90: 183-195.
- 346. RHYAN JC, STACKHOUSE LL, QUINN WJ.** (1988) Fetal and placental lesions in bovine abortion due to *Tritrichomonas foetus*. Vet. Pathol. 25(5): 350-355.
- 347. RHYAN JC, WILSON KL, BURGESS DE, STACKHOUSE LL, QUINN WJ.** (1995) Immunohistochemical detection of *Tritrichomonas foetus* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of bovine placenta and fetal lung. J. Vet. Diagn. Invest. 7(1): 98-101.
- 348. RICHTZENHAIN, L.J., CORTEZ, A., HEINEMANN, M.B., SOARES, R.M., SAKAMOTO, S.M., VASCONCELLOS, S.A., MORAIS HIGA, Z.M., SCARCELLI, E. and GENOVEZ, M.E.** (2002) A multiplex PCR for the detection of *Brucella* spp. and *Leptospira* spp. DNA from aborted bovine fetuses. Vet. Microbiol. 87: 139-147.
- 349. RIDPATH, J.F., BOLIN, S.R. and DUBOVI, E.J.** (1994) Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. Virol. 205: 66-74.
- 350. RINGS, D.M** (1985) Salmonellosis in calves. Vet. Clin. N. Am. Food. Anim. Pract. 1: 529-539.
- 351. ROBERTS S.J.** Veterinary obstetrics and genital diseases theriogenology, 3<sup>rd</sup> ed., Woodstock, VT: Published by the Author; 1986. p. 19.
- 352. ROBLES, C.A.** (2003) Brucelosis Bovina. 1ra edición. Ed: Carlos A. Robles. Grupo de Sanidad Animal. INTA Bariloche. p 1-50.
- 353. ROCHA MA, BARBOSA EF, GUEDES RM, LAGE AP, LEITE RC, GOUVEIA AM.** (1998) Detection of BHV-1 in a naturally infected bovine fetus by a nested PCR assay. Vet. Res. Commun. 23(2): 133-141.
- 354. ROMERO, C., GAMAZO, C., PARDO, M. and LÓPEZ-GOÑI, I.** (1995) Specific Detection of *Brucella* DNA by PCR. J. Clin. Microbiol. 33: 615-617.

- 355. RONG LUN, Z., PARKER, S. and GAJADHAR, A.A.** (2000) Comparison of growth rates of *Tritrichomonas foetus* isolates from various geographic regions using three different culture media. *Vet. Parasitol.* 89: 199–208
- 356. ROSSEN, L., NORSKOV, P., HOLMSTROM, K. and RASMUSSEN, O.F.** (1992) Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int. J. Food Microbiol.* 17: 37-45.
- 357. ROSSETTI, C.A., VANASCO, B.N., PINI, N. and CARFAGNINI, J.C.** (2004) Comparison of three diagnostic techniques for the detection of leptospire in the kidneys of wild house mice (*Mus musculus*). *Pesq. Vet. Bras.* 24: 6-10.
- 358. ROUSSEAU CG.** (1994) Congenital defects as a cause of perinatal mortality of beef calves. *Vet. Clin. N. Am. Food. Anim. Pract.* 10(1): 35-51.
- 359. SAED, O.M. and AL-AUBAIDI, J.M.** (1983) Infertility in heifers caused by pathogenic strain of *Mycoplasma Bovigenitalium*. *Cornell Vet.* 73: 125-130.
- 360. SAGER, H., FISCHER, I., FURRER, K., STRASSER, M., WALDVOGEL, A., BOERLIN, P., AUDIGE, L. and GOTTSTEIN, B.** (2001) A Swiss case-control study to assess *Neospora caninum*- associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. *Vet. Parasitol.* 102: 1-15.
- 361. SAGLAM, Y.S., YENER, Z., TEMUR, A. and. YALCIN, E.** (2008) Immunohistochemical detection of leptospiral antigens in cases of naturally occurring abortions in sheep. *Small Rum. Res.* 74: 119–122.
- 362. SANDERSON, M.W. and CHENOWETH, P.J.** (1999) The role of *Ureaplasma diversum* in Bovine Reproduction. *Comp.* 21: 98-101.
- 363. SANDHU, K.S, JOSHI, D.V. and NARENDRA KUMAR, I.** (1986) Isolation and demonstration of *Brucella* organisms by fluorescent antibody test and special staining technique. *Acta Veterinaria.* 36(4): 223-228.
- 364. SANDVIK, T.** (1999) Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. *Vet. Microbiol.* 64: 123-134.
- 365. SANDVIK, T.** (2005) Selection and use of laboratory diagnostic assays in BVD control programmes. *Prev. Vet. Med.* 72: 3-16.
- 366. SAMARTINO, L.E. and ENRIGHT, F.M.** (1993) Pathogenesis of abortion of bovine brucellosis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 16: 95-101.
- 367. SAMARTINO, L.E.** (2002) Brucellosis in Argentina. *Vet. Microbiol.* 90: 71-80.
- 368. SANTOS, S.M. and AMARAL, V.** (1974) Tricomoniase bovina: Métodos de coleta de material para fins diagnósticos. *O Biológico.* 40(12): 346-352.

- 369. SANZ, A., BRUÑES, A. and VILLALBA, D.** (2004) Influence of management and nutrition on postpartum interval in Brown Swiss and Pirenaica cows. *Livest. Prod. Sci.* 86: 179-191.
- 370. SARAVID, M.A., Wright, P.F., GREGORET, R.J. and GALL, D.E.J.** (1995) Comparative performance of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and conventional assays in the diagnosis of bovine brucellosis in Argentina. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 47: 93-99.
- 371. SAS** (2002). SAS/STAT user's guide U.9.1, CARY, NC, USA.
- 372. SAVINI, G., DUNSMORE, J.D. and ROBERTSON, I.D.** (1996) Studies on pathogenesis, tissue infection and congenital transmission in cows experimentally infected with *Sarcocystis cruzi* by various routes. *Vet. Parasitol.* 64: 319-327.
- 373. SAWADA, M., KONDO, H., TOMIOKA, Y., PARK, C., MORITA, T., SHIMADA, A., et al.** (2000) Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected adult dairy cow. *Vet. Parasitol.* 90: 247-252.
- 374. SCANZIANI E, LUINI M, FABBI M, PIZZOCARO P.** (1991) Comparison between specific immunoperoxidase staining and bacteriological culture in the diagnosis of renal leptospirosis of pigs. *Res. Vet. Sci.* 50(2): 229-232.
- 375. SCHOCK A, BUXTON D, SPENCE JA, LOW JC, BAIRD A.** (2000) Histopathological survey of aborted bovine fetuses in Scotland with special reference to *Neospora caninum*. *Vet. Rec.* 147: 687-688.
- 376. SCHODER, D., SCHMALWIESER, A., SCHAUBERGER, G., KUHN, M., HOOFFAR, J. and WAGNER, M.** (2003) Physical characteristics of six new thermocyclers. *Clin. Chem.* 49: 960-963.
- 377. SCHULZE, F., BAGON, A., MÜLLER, W. and HOTZEL, H.** (2006) Identification of *Campylobacter fetus* subspecies by phenotypic differentiation and PCR. *J. Clin. Microbiol.* 44: 2019-2024.
- 378. SCHULTZ, R.D.** (1973) Developmental aspects of the fetal bovine immune response: a review. *Cornell. Vet.* 63: 507-531
- 379. SCHMITT, B. and HENDERSON, L.** (2005) Diagnostic tools for animal diseases. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 24 (1): 243-250
- 380. SELEEM, M.N., BOYLE, S.M. and SRIRANGANATHAN, N.** (2010) Brucellosis: a re-emerging zoonosis. *Vet. Microbiol.* 140:392-398.
- 381. SHARON, N. and LIS, H.** (1989) Lectins as cell recognition molecules. *Sci.* 246: 227-234.

- 382. SILVA, F.L., PAIXAO, T.A., BORGES, A.M., LAGE, A.P. and SANTOS, R.L.** (2005) Brucelose bovina. *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia*. 47: 1-12.
- 383. SKILBECK, N.W., FORSYTH, W.M. and DOHNT, M.** (1988) Bovine leptospirosis: Microbiological and histological findings in cattle at slaughter. *Aust. Vet. J.* 65(3): 73-75.
- 384. SKIRROW, S.Z. and BONDURANT, R.H.** (1990) Induced *Trichostrongylus axei* infection in beef heifers. *J.Am. Vet. Med. Assoc.* 15 (196): 885-889.
- 385. SMITH CR, KETTERER PJ, McGOWAN MR, CORNEY BG.** (1994) A review of laboratory techniques and their use in the diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* infection in cattle. *Aust. Vet. J.*71(9): 290-294.
- 386. SMITH, G.H., COLLINS, J.K. and CARMAN, J.** (1989) Use of an immunoperoxidase test for the detection of bovine herpesvirus-1 in aborted fetal tissue. *J.Vet. Diagn. Invest.* 1: 39-44.
- 387. SMITH, K.C.** (1997) Herpesviral abortion in domestic animals. *Vet. J.* 153: 239-244.
- 388. SMITH, R.L., SANDERSON, M.W. WALZ, P.H. and GIVENS, M.D.** (2008) Sensitivity of polimerase chain reaction for detection of bovine viral diarrhea virus in pooled serum samples and use of pooled polymerase chain reaction to determine prevalence of bovine viral diarrhea virus in auction market cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20: 75-78.
- 389. SMITH, R.E. and DENNIS, S.M.** Listeric abortion in cattle and sheep. In Kirkbride CA (ed): *Laboratory Diagnosis of Livestock Abortion*, 3<sup>rd</sup> ed, p 52. Ames, Iowa State University Press, 1990.
- 390. SÖNDGEN, P., PETERS, M., BÄRWALD, A., WURMA, R., HOLLING, F., CONRATHS, F.J., SCHARES, G.** (2001) Bovine neosporosis: immunoblot improves foetal serology. *Vet. Parasitol.*102: 279–290
- 391. SPICER, S. and SCHULTE, B.** (1992) Diversity of cell glycoconjugates shown histochemically. A perspective. *J. Histochem. Cytochem.* 40: 1-38.
- 392. STOTT, J.L., BLANCHARD, M.T., ANDERSON, M., MAAS, J., WALKER, R.L., KENNEDY, P.C., NORMAN, B.B., BONDURANT, R.H., OLIVER, M.N., HANKS, D. and HALL, M.R.** (2002) Experimental transmission of epizootic bovine abortion (Foothill abortion). *Vet. Microbiol.* 88: 161-173.
- 393. SWASDIPAN, S., McGOWAN, M., PHILLIPS, N. and BIELEFELDT-OHMANN, H.** (2002) Pathogenesis of transplacental virus infection: pestivirus

replication in the placenta and fetus following respiratory infection. *Microb. Pathog.* 32: 49-60.

**394. SZEKERES-BARTHO, J.** (2002) Immunological relationship between the mother and the fetus. *Int. Rev. Immunol.* 21: 471-495.

**395. TAKIUCHI, E., MEDICI, K.C., ALFIERI, A.F. and ALFIERI, A.A.** (2005) Bovine herpesvirus type 1 abortions detected by semi-nested PCR in Brazilian cattle herds. *Res. Vet. Sci.* 79: 85-88.

**396. THELLIN, O. and HEINEN, E.** (2003) Pregnancy and the immune system: between tolerance and rejection. *Toxicol.* 185: 179-184.

**397. TEDESCO, L.F., ERRICO, E. and DEL BAGLIVI, L.P.** (1979) Diagnosis of *Tritrichomonas Foetus* infection in bulls using two sampling methods and transport medium. *Aust. Vet. J.* 55: 322-324.

**398. TEGLAS, M.B., DRAZENOVICH, N.L., STOTT, J. And FOLEY, J.E.** (2006) The geographic distribution of the putative agent of epizooticbovine abortion in the tick vector, *Ornithodoros coriaceus* . *Vet. Parasitol.* 140: 327-333.

**399. TENTER, A.M.** (1997) Current research on *Sarcocystis* species of domestic animals. *Int. J. Parasitol.* 25: 1311-1330.

**400. TEMUR, A. and SAGLAM, Y.S.** (2003) Immunoperoxidase studies on leptospirosis in bovine abortion. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science.*

**401. TERZOLO, H. R., PAOLICCHI, F. A., MOREIRA, A. R. and HOMSE,A.** (1991) Skirrow agar for simultaneous isolation of *Brucella* and *Campylobacter* species. *Vet. Rec.* 129: 531-532.

**402. THELLIN, O. and HEINEN, E.** (2003) Pregnancy and the immune system: between tolerance and rejection. *Toxicol.* 185: 179-184.

**403. THURMOND, M.C., PICANSO, J.P. and JAMESON, C.M.** (1990b) Considerations for use of descriptive epidemiology to investigate fetal loss in dairy cows. *J.A.V.M.A.* 197: 1305-1312.

**404. THURMOND, M.C., PICANSO, J.P. and HIETALA, S.** (1990c) Prospective serology and analysis in diagnosis of dairy cow abortion. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2: 274-282.

**405. THURMOND, M.C., BLANCHARD, P.C. and ANDERSON, M.L.** (1994) An example of selection bias in submissions of aborted bovine fetuses to a diagnostic laboratory. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6: 269-271.

- 406. TIZARD, I.R.** (1986) *Veterinary Immunology*. 8<sup>th</sup> edition. (ed): Jolynn Gower, St. Louis, Saunders, Elsevier Inc, 2009.
- 407. UZAL, F.A., CARRASCO, A.E., NIELSEN, K., ECHAIDE, S. and CABRERA, R.F.** (1996) An indirect ELISA using a monoclonal anti IgG<sub>1</sub>, enzyme conjugate for the diagnosis of bovine brucellosis. *Vet. Microbiol.* 52: 175-180.
- 408. VAN BERGEN M.A., LINNANE, S., VAN PUTTEN, J.P. and WAGENAAR, J.A.** (2005) Global detection and identification of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 24: 1017-1026.
- 409. VAN BERGEN, M.A., VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS, L., VISSER I.J.R., VAN PUTTEN, J.P.M. and WAGENAAR, J.A.** (2006) Molecular epidemiology of *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* on bovine artificial insemination stations using pulsed field gel electrophoresis. *Vet. Microbiol.* 112: 65-71.
- 410. VAN ENGELENBURG, F. A. C.; MAES, R. K.; VAN OIRSCHOT, J. T. and RIJSEWIJK, F. A. M.** (1993): Development of a Rapid and Sensitive Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of Bovine Herpesvirus Type 1 in Bovine Semen. *J. Clin. Microbiol.* 31(12): 3129-3135.
- 411. VAN ENGELENBURG, F. A. C.; VAN SCHIE, F. W.; RIJSEWIJK, F. A. M. y VAN OIRSCHOT, J. T.** (1995): Excretion of Bovine Herpesvirus 1 in Semen Is Detected Much Longer by PCR than by Virus Isolation. *J. Clin. Microbiol.* 33(2): 308-312.
- 412. VAN EYS, G.J.J.M., GRAVEKAMP, C., GERRITSEN, M.J., QUINT, W., CORNELISSEN, M.T.E., SCHEGGET, J.T. and TERPSTRA, W.J.** (1989) Detection of Leptospire in Urine by Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol.* 27: 2258-2262.
- 413. VAN HUFFELL, X. and DE MOOR, A.** (1987) Congenital Multiple Arthrogryposis of the Forelimbs in Calves. *Comp. Food Animal.* 9(10): 333-339.
- 414. VAN MAANEN, C., WOUDA, W., SCHARES, G., VON BLUMRODER, D., CONRATHS, F.J., NORTON, R., WILLIAMS, D.J., ESTEBAN-REDONDO, I., INNES, E.A., MATTSSON, J.G., BJORKMAN, C., FERNANDEZ-GARCIA, A., ORTEGA-MORA, L.M., MULLER, N., SAGER, H. and HEMPHILL, A.** (2004) An interlaboratory comparison of immunohistochemistry and PCR methods for detection of *Neospora caninum* in bovine foetal tissues. *Vet Parasitol.* 126: 351-64.
- 415. VANROOSE, G., de KRUIF, A. and VAN SOOM, A.** (2000) Embryonic mortality and embryo-pathogen interactions. *Anim. Reprod. Sci.* 60: 131-143.

416. VARGAS, A.C., COSTA, M.M., VAINSTEIN, M.H., KREUTZ, L.C. and NEVES, J.P. (2003) Phenotypic and molecular characterization of bovine *Campylobacter fetus* strains isolated in Brazil. *Vet. Microbiol.* 93: 121-132.
417. VARGAS, O. and FRANCISCO, J. (2002) Brucellosis in Venezuela. *Vet. Microbiol.* 90: 39-44.
418. VASCONCELLOS CARDOSO, M., BLANCHARD, A., FERRIS, S., VERLENGIA, R., TIMENETSKY, T. and FLORIO DA CUNHA, R.A. (2000) Detection of *Ureaplasma diversum* in cattle using a newly developed PCR-based detection assay. *Vet. Microbiol.* 72: 241-250.
419. VENTURINI, L., DILORENZO, C., VENTURINI, C. and ROMERO, J. (1995) Anticuerpos anti *Neospora* sp en vacas que abortaron. *Vet. Arg.* 12: 167-170.
420. VENTURINI, MC., VENTURINI, L., BACIGALUPE, D., MACHUCA, M., ECHAIDE, I., BASSO, W., UNZAGA, J.M., Di LORENZO, C., GUGLIELMONE, A., JENKINS, M.C., DUBEY, J.P. (1999) *Neospora caninum* infections in bovine foetuses and dairy cows with abortions in Argentina. *Int. J. Parasitol.* 29: 1705-1708.
421. VIDA. (2000) Veterinary Investigation Surveillance Report 1993-2000 (Veterinary Laboratories Agency, Weybridge, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food), 1-22.
422. VIDA. (2001) Veterinary Investigation Surveillance Report 1994-2001 (Veterinary Laboratories Agency, Weybridge, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food), 1-22.
423. VIDA. (2008) Veterinary Investigation Surveillance Report 1994-2001 (Veterinary Laboratories Agency, Weybridge, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food), 1-30.
424. VILCEK, S., NETTLETON, P.F., HERRING, J.A. and HERRING, A.J. (1994) Rapid detection of bovine herpesvirus 1 (BHV 1) using the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 42: 53-64.
425. VILCEK, S., STROJNY, L., DURKOVIC, B., ROSSMANITH, W. and PATON, D. (2001) Storage of bovine viral diarrhoea virus samples on filter paper and detection of viral RNA by a RT-PCR method. *J. Virol. Meth.* 92: 19-22.
426. VILLAR, J.A. (1979) Algunos conceptos sobre el aborto bovino. *Rev. Med. Vet.* 60: 232-242.
427. WAGENAAR, J., ZUERNER, R.L., ALT, D. and BOLIN, C.A. (2000) Comparison of polymerase chain reaction assays with bacteriologic culture, immunofluorescence, and nucleic acid hybridization for detection of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo in urine of cattle. *Am- J. Vet. Res.* 61(3): 316-320.

- 428. WAGENAAR, J.A., VAN BERGEN, M.A., NEWELL, D.G., GROGONOTHOMAS, R. and DUIM, B.** (2001) Comparative Study Using Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprinting, PCR Genotyping, and Phenotyping To Differentiate *Campylobacter fetus* Strains Isolated from Animals. *J. Clin. Microbiol.* 39: 2283-2286.
- 429. WALDNER, C.L.** (2005) Serological status for *N. caninum*, bovine viral diarrhoea virus, and infectious bovine rhinotracheitis virus at pregnancy testing and reproductive performance in beef herds. *Anim. Reprod. Sci.* 90: 219–242.
- 430. WALKER RL.** Mycotic bovine abortion. In: Youngquist RS, Threlfall WR, editors. *Current therapy in large animal theriogenology*, 2<sup>nd</sup> ed., WB Saunders Co., 2007. p. 417-9.
- 431. WEINSTOCK, D., BHUDEVI, B. and CASTRO, A.E.** (2001) Single-tube single-enzyme reverse transcriptase PCR assay for detection of bovine viral diarrhoea virus in pooled bovine serum. *J. Clin. Microbiol.* 39 (1): 1343-346.
- 432. WEI-TANG, Y., PROCOP, G.W. and PERSING, D.H.** (1997) Molecular diagnostic of infectious diseases. *Clinical Chemistry.* 43(11): 2021- 2038.
- 433. WHITE, A., HANSEN-LARDY, L., BRODERSEN, B. and KELLING, C.** (1998) Enhanced immunohistochemical detection of infectious agents in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues following heta-mediated antigen retrieval. *J.Vet. Diag. Invest.* 10: 214-217.
- 434. WILLIAMS, D.J.L., GUY, C.S., MCGARRY, J.W., GUY, F., TASKER, L., SMITH, R.F., MacEACHERN, K., CRIPPS, P.J., KELLY, D.F., TREES, A.J.** (2000) *Neospora caninum*- associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitemia during gestation determines foetal survival. *Parasitol.* 121: 347-358.
- 435. WILLIAMS, D.J.L., GUY, C.S., SMITH, R.F., GUY, F., MCGARRY, J.W., MCKAY, J.S. and TREES, A.J.** (2003) First demonstration of protective immunity against fetopathy in cattle with latent *Neospora caninum* infection. *Int. J. Parasitol.* 33: 1059-1065.
- 436. WILLOUGHBY K, NETTLETON PF, QUIRIE M, MALEY MA, FOSTER G, TOSZEGHY M, NEWELL DG.** (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(4): 758-766.

- 437. WILSON, I.** (1997) Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3741-3751.
- 438. WITHERSPOON, D.M. and WALKER, D.F.** (1966) New way to Diagnose Thichomoniasis in Bulls. *Mod. Vet. Pract.* 47: 50-54.
- 439. WOELFFER, E.A.** (1972) Diagnosis of bovine abortion. *J.A.V.M.A.* 161: 1284-1287.
- 440. WOLFGANG, D.** (2003a) Investigating abortions in cattle: part III. Interpretation of results associated with bacteria, Dairy & Animal Science Dairy Digest, DAS 66, Penn State College of Agricultural sciences, USA,
- 441. WOLFGANG, D.** (2003b) Investigating abortions in cattle: part III. Interpretation of results associated with viruses, Dairy & Animal Science Dairy Digest, DAS 68, Penn State College of Agricultural sciences, USA,
- 442. WORLD HEALTH ORGANIZATION** (2003) Human Leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. WHO Library Cataloguing- in-Publication Data.
- 443. WOUDA W, MOEN AR, VISSER IJ. and VAN KNAPEN F.** (1997) Bovine fetal neosporosis: a comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different age classes with regard to lesion severity and immunohistochemical identification of organisms in brain, heart, and liver. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9: 180-185.
- 444. WOUDA, W., BRINKHOF, J.M., Van MAANEN, C., de GEE, A.L.W. and MOEN, A.R.** (1998a) Serodiagnosis of neosporosis in individual cows and dairy herds: a comparative study of three enzumed-linked immunosorbent assays. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 5: 711-716.
- 445. WOUDA, W., DIJKSTRA, T., KRAMER, A.M., Van MAANEN, C. and BRINKHOF, J.M.** (1999) Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. *Int. J. Parasitol.* 29: 1677-1682.
- 446. WREN, G.** (1999). Abortions in cattle. *Bov. Vet.* p.18-22.
- 447. WYRICK, P.B. and RICHMOND, S.J.** (1989) Biology of chlamydiae. *JAVMA.* 195: 1507- 1512.
- 448. XAVIER, M.N., PAIXAO, T.A., POESTER, F.P., LAGE, A.P. and SANTOS, R.L.** (2009) Pathological, immunohistochemical, and bacteriological study of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with *Brucella abortus*. *J. Comp. Pathol.* 140: 149-157.

- 449. YAEGER, M.J. and HOLLER, L.D.** (2007) Bacterial causes of bovine infertility and abortion. En: Youngquist, R.S., Threlfall, W.R. Current therapy in large animal theriogenology. 2<sup>nd</sup> Ed. Publisher by W.B Saunders, Philadelphia, USA.389-398.
- 450. YAPKIC, O., YAVRU, S., BULUT, O., KALE, M. and ATA, A.** (2006) Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in pregnant cows and their fetuses. Bull. Vet. Institute in Pulawy. 50 (3): 315-317.
- 451. YENER, Z. and KELES, H.** (2001) Immunoperoxidase and histopathological examinations of leptospiral nephritis in cattle. J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med. 48: 441-447.

## 9. APENDICES

### APENDICE 1

#### Extracción de ADN a partir de fluidos con isopropanol

- 1) Descongelar las muestras
- 2) Obtener una alícuota de 400 µl de cada muestra y colocarlas en tubos Eppendorf libres de ADN asas.
- 3) Agregar 1000 µl de **Buffer de lisis de glóbulos rojos (Apéndice 3)** Agitar en vortex e incubar 10 min a temperatura ambiente. Centrifugar a 14.000 rpm por 10 min a TA.
- 4) Retirar el sobrenadante cuidadosamente con micropipeta sin tocar el sedimento.
- 5) Agregar 1000 µl de agua destilada, mezclar para lavar el sedimento y centrifugar 4 min a 14.000 rpm. Volcar cuidadosamente el sobrenadante y repetir el lavado hasta obtener un sobrenadante claro y transparente.
- 6) Adicionar 400 µl de **Buffer de lisis (1) (Apéndice 3)** y 8 µl de proteinasa K (20mg/ml). Mezclar bien despegando el sedimento con el tip e incubar 1 hora (como mínimo) en baño a 58° C. Luego de este paso puede quedar a TA por un tiempo prolongado.
- 7) Refrigerar las muestras 10 min y agregar 400 µl de **Buffer de precipitación acetato de NH<sub>4</sub> (7.5M) (Apéndice 3)**. Agitar en vortex por 15 segundos y centrifugar 10-15 min a 14.000 rpm.
- 8) Se colocan en otros microtubos identificados 500 µl de isopropanol y se coloca el sobrenadante de los tubos del paso anterior. Para esta maniobra se utilizan tips con filtro *ad hoc*. Se cierran bien los tubos y se agitan 50 veces para que se formen los ovillos de ADN. Se centrifugan 3 min a 14.000 rpm. Se vuelca el sobrenadante y los tubos se dejan boca abajo para que se sequen.
- 9) Se agregan 500 µl de etanol 75%, se enjuaga el ADN y se centrifuga a 14.000 rpm por 3 min. Se dejan secar boca abajo por 30 min.
- 10) El ADN se resuspende en 100 µl de agua destilada (pura o bidestilada) o **Buffer TE (Apéndice 3)**.

## APENDICE 2

### Extracción de ADN a partir de tejidos con isopropanol

- 1) Inactivar las muestras 15 min a 80° C, centrifugar 2 min a 14.000 rpm y descartar el sobrenadante.
- 2) Lavar con 500 µl de agua destilada e ir macerando los tejidos con un tip. Se hacen dos lavados (lavado-centrifugación) durante 3 min a 14.000 rpm en una centrífuga común.
- 3) Adicionar 500 µl de **Buffer de lisis (1) (Apéndice 3)**, se vuelve a macerar el tejido y se agregan 10 µl de proteinasa K (20mg/ml). Se deja incubar durante 3 horas a 55° - 58° C. Cumplida la primera hora es conveniente mezclar las muestras en un vortex.  
Optativo: agregar 3 µl de RNAsa, mezclar bien e incubar 15 a 60 min a 37° C.
- 4) Luego de la incubación en baño María las muestras se colocan en el freezer para completar la lisis celular.
- 5) Adicionar 500 µl de **Buffer de precipitación acetato de NH<sub>4</sub> (7.5M) (Apéndice 3)**. En este punto deben precipitar bien las proteínas para lo cual se centrifuga por 15 min a 14.000 rpm. Si el sobrenadante queda sucio, se vuelve a precipitar con el buffer hasta que quede límpido. A partir de este punto se utiliza la centrífuga de 4° C.
- 6) En otros microtubos se colocan 500 µl de isopropanol y se extare el sobrenadante de los tubos del paso anterior (se utilizan tips con filtro). Se cierran bien los tubos y se agitan 50 veces para que se formen los ovillos de ADN. Se centrifugan 3 min a 14.000 rpm. Se vuelca el sobrenadante y se dejan boca abajo para que se sequen.
- 7) Se agregan 500 µl de etanol 75%, se enjuaga el ADN y se centrifuga a 14.000 rpm por 3 min. Se dejan secar boca abajo por 30 min.
- 8) El ADN se resuspende en 100 µl de agua destilada (pura o bidestilada) o **Buffer TE (Apéndice 3)**.

**APENDICE 3****Buffer para lisis de glóbulos rojos**

NH <sub>4</sub> Cl	0,14 M
Tris-ClH	0,017 M

**Buffer de lisis (1)**

Tris-ClH (pH 8)	0,05 M
EDTA	0,1 M
CINa	0,1 M
SDS	2%
H <sub>2</sub> O bidestilada	c.s.p 1 litro
Ajustar el pH al final	

**Buffer de lisis (2)**

Proteinasa K (Gibco)	10 mg/ml	15 µl
SDS	10 %	30 µl
TNE	5X	60 µl
Agua ultrapura		195 µl

**Buffer de precipitación**

Acetato de amonio	7.5 M
H <sub>2</sub> O bidestilada	

**Buffer TBE**

Solución stock 10X, para 1 litro

Tris base	0,089 M
Acido bórico	0,089 M
EDTA	40 ml 0,5 M

**Buffer TE**

Tris Cl, pH 7,4 u 8,0	10 mM
EDTA, pH 8,0	1 mM

**Buffer TNE 5X**

Tris-HCl pH 8,0	50 mM
ClNa	500 mM
EDTA	125 mM

**Buffer WCLB**

Tris pH 7,6 (ajustar con HCl)	10 mM
EDTA pH 8,0	10 mM
ClNa	50 mM

Autoclavar 20 min y luego agregar 0,2% de SDS, preparar 15 ml

**PBS**

ClNa	8 g/l
KCl	0,2 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g/l
Ajustar a pH 7,4	

**Buffer de dilución de fluidos fetales para IFI de *N. caninum***

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,19 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,22 g
ClNa	8,55 g
Albúmina sérica bovina	10,0 g
Agua bidestilada	c.s.p. 1 litro

**Etanol: acetato (24:1)**

Etanol absoluto	2.400 µl
Acetato de Na 3M (pH 8)	100 µl

## APENDICE 4

### Extracción de ADN a partir de tejidos y/o fluidos con fenol-cloroformo-isoamílico

- 1) Colocar 200 ó 300  $\mu$ l de muestra en microtubos Eppendorf estériles y libres de ADN-asa. Si la muestra es de tejido, lavarla previamente con 500  $\mu$ l de PBS e ir macerando. Hacer 2 lavados de 3 min a 14.000 rpm, luego extraer 200 o 300  $\mu$ l del sobrenadante.
- 2) Adicionar 400 de **buffer de lisis (1) (Apéndice 3)** y 10  $\mu$ l de proteinasa K (20 mg/ml). Mezclar bien e incubar durante 3 horas a 58° C. Luego de este paso, las muestras pueden quedar a temperatura ambiente por meses.
- 3) Refrigerar las muestras 10 min y agregar 400  $\mu$ l de **Buffer de precipitación acetato de NH<sub>4</sub> (7.5M) (Apéndice 3)**. Agitar en el vortex 15 seg y centrifugar 10-15 min a 14.000 rpm.
- 4) Extraer el ADN del sobrenadante de la etapa anterior y adicionar un volumen de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) igual al de la muestra. Mezclar bien con vortex y centrifugar a 10.000 rpm durante 5 min. El fenol precipita y el ADN queda en la fase acuosa. Este paso se repite hasta que la fase acuosa quede límpida.
- 5) Extraer el ADN de la fase acuosa y precipitarlo con etanol-acetato 3 M en el mismo volumen que la muestra de ADN. Dejar la muestra toda la noche a -20° C para que precipiten el ADN y el etanol-acetato.
- 6) Centrifugar a 14.000 rpm durante 3 min a 4° C. Lavar con etanol 75% para eliminar el acetato, centrifugar nuevamente a a 14.000 rpm durante 3 min a 4° C. Dejar secar los microtubos boca abajo durante 30 min.
- 7) Resuspender el ADN con 100  $\mu$ l de **Buffer TE (Apéndice 3)** o agua bidestilada.

## APENDICE 5

### Extracción de ADN a partir de tejidos en parafina

- 1) Obtener el casete con el tejido a procesar embebido en parafina.
- 2) Realizar varios cortes con el microtómo de 30 a 50  $\mu$  y colocarlos en microtubos Eppendorf estériles y nuevos.
- 3) Agregar octano (de preferencia) o xilol hasta cubrir los cortes tisulares y agitar durante 30 min. De vez en cuando se puede colocar el microtubo Eppendorf en un baño María tibio para facilitar la dilución de la parafina.
- 4) Centrifugar 5 min a 14.000 rpm y descartar el octano o xilol.
- 5) Repetir el paso 3 y 4.
- 6) Observar bien el tejido para que no haya quedado parafina. Si esto ocurre, repetir los pasos 3 y 4.
- 7) Agregar 1 ml de acetona y agitar 5 min.
- 8) Centrifugar a 14.000 rpm y descartar la acetona.
- 9) Repetir el lavado- centrifugación (a 14.000 rpm) con acetona hasta 4 veces.
- 10) Lavar con 1 ml de etanol 100%, mezclar y centrifugar a 14.000 rpm. Descartar el sobrenadante.
- 11) repetir el lavado con etanol 100%.
- 12) Dejar secar muy bien el tejido con el microtubo destapado al aire y asegurarse de que el pellet esté seco.
- 13) Pasar el pellet a un microtubo Eppendorf nuevo y agregar 500  $\mu$ l de **Buffer WCLB (Apéndice 3)** y 15  $\mu$ l de Proteinasa K (2.000  $\mu$ g/ml).
- 14) Incubar a 50° C con agitación hasta la total disgregación del tejido (4 a 5 hs o toda la noche a 42° C).
- 15) Extraer el ADN con fenol-cloroformo en partes iguales y precipitar con acetato de sodio 3M, pH 5,2, 1/10 del volumen que haya. Mezclar y agregar 2 volúmenes de etanol absoluto a 4° C, dejar 20 min a -20° C y centrifugar a 14.000 durante 3 min. Descartar el sobrenadante y dejar secar los microtubos Eppendorf boca abajo.
- 16) Resuspender el ADN con 100  $\mu$ l de **Buffer TE (Apéndice 3)** o agua bidestilada.

## APENDICE 6

### Extracción de ADN a partir de tejidos fijados en formol.

- 1) Obtener un pequeño trocito de tejido, cortarlo con bisturí y lavarlo dos veces con **PBS (Apéndice 3)**.
- 2) Desmenuzar el tejido lo más posible y resuspenderlo en 100  $\mu$ l de buffer de lisis. Dejarlo a 37° C durante toda la noche.
- 3) Agregar 1.5 volúmenes del volumen original de fenol: cloroformo: isoamílico (25:24:1).
- 4) Agitar 15 min a temperatura ambiente (no con vortex) y centrifugar 15 min a 1.4000 rpm.
- 5) Separar con cuidado la capa acuosa (superior). Agregar un volumen igual de cloroformo: isoamílico (24:1).
- 6) Agitar 15 min a temperatura ambiente (no con vortex) y centrifugar 15 min a 1.4000 rpm.
- 7) Agregar 0.1 volumen de 3M Acetato de Sodio pH 5,5 y 2,5 volúmenes (del volumen existente en el tubo) de etanol absoluto frío. Dejar unas horas o toda la noche a -20° C.
- 8) Al día siguiente centrifugar a 14.000 rpm durante 20 min.
- 9) Lavar el precipitado con etanol 70% y dejar que se evapore.
- 10) Resuspender el ADN con 100  $\mu$ l de **Buffer TE (Apéndice 3)** o agua bidestilada.

## APENDICE 7

### Extracción de ADN con Resina

- 1) Descongelar y homogeneizar con vortex las muestras de contenido de abomaso y humor acuoso.
- 2) Sacar 100  $\mu$ l de cada muestra y centrifugar a 800 g durante 10 min.
- 3) Recoger 90  $\mu$ l del sobrenadante de los tubos del paso anterior y colocarlos en otros microtubos nuevos.
- 4) Centrifugar a 13.000 g durante 15 min a 4° C. Descartar el sobrenadante muy cuidadosamente para no arrastrar el ADN.
- 5) Agregar a los tubos 100  $\mu$ l de resina y usar el vortex durante 10 seg siempre en agitación con el vortex porque la resina precipita rápidamente.
- 6) Incubar a 56° C durante 15 a 30 min (si es posible en baño María con agitación), sacar las muestras y agitar con vortex 10 seg.
- 7) Incubar a 96-100° C de 8 a 10 min y luego agitar con vortex 10 seg.
- 8) Centrifugar a 10.000 rpm durante 2-3 min.
- 9) Extraer muy lentamente el sobrenadante que contiene el ADN y colocarlo en microtubos de 0,5 ml. Guardar a -20° C hasta su uso.

## APENDICE 8

### Extracción de ADN con tratamiento enzimático

- 1) Se adicionan 400  $\mu$ l de **Buffer TE (Apéndice 3)** a 200  $\mu$ l de una suspensión de tejido obtenida previamente mediante macerado con agua ultrapura al 10% p/v o 200  $\mu$ l de contenido de abomaso. Se agitan y se centrifugan a 10.000 rpm durante 5 min.
- 2) El sedimento se resuspende en 300  $\mu$ l de un **buffer de lisis (2) (Apéndice 3)** y se incuba a 56° C durante 2 horas.
- 3) El ADN obtenido primero se purifica con fenol saturado con un volumen igual al que tiene la muestra y se agita con vortex durante 3 min.
- 4) Se centrifugan las muestras a 10.000 rpm durante 5 min y se transfiere la fase superior a otro microtubo Eppendorf y se mezcla con fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) a la mitad del volumen que tiene la muestra.
- 5) Se realiza la precipitación con etanol y luego el pellet se resuspende con 100  $\mu$ l de **Buffer TE (Apéndice 3)**.

## APENDICE 9

### Extracción de ADN mediante ebullición

- 1) Se adicionan 400 µl de **Buffer TE (Apéndice 3)** a 200 µl de una suspensión de tejido obtenida previamente mediante macerado con agua ultrapura al 10% p/v o 200 µl de contenido de abomaso. Se agita durante 10 seg y se centrifuga a 10.000 rpm durante 5 min.
- 2) El pellet se resuspende en 400 µl de **Buffer TE (Apéndice 3)**, se mezcla la muestra mediante vortex y se somete a ebullición durante 15 min.
- 3) El ADN obtenido primero se purifica con fenol saturado con un volumen igual al que tiene la muestra y se agita con vortex durante 3 min.
- 4) Se centrifugan las muestras a 10.000 rpm durante 5 min y se transfiere la fase superior a otro microtubo Eppendorf y se mezcla con fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) a la mitad del volumen que tiene la muestra.
- 5) Se realiza la precipitación con etanol y luego el pellet se resuspende con 100 µl de **Buffer TE (Apéndice 3)**.

## APENDICE 10

### Extracción de ADN a partir de tejidos con Chelex 100 ®

- 1) Se realiza un macerado a partir de la muestra en PBS estéril en una relación 1/10 (0,5 gr en 5 ml) o también puede ser en una relación 1/5.
- 2) Preparar el Chelex al 5% con agua ultrapura y dejar agitar la solución con una barra magnética durante 15 minutos antes de utilizarlo.
- 3) Colocar en un microtubo Eppendorf 200 µl de Chelex al 5% y añadir 200 µl del sobrenadante (vol/vol) obtenido del macerado de la muestra. Mezclar pipeteando varias veces.
- 4) Añadir inmediatamente y mezclar con pipeta: 2 µl de proteinasa K 100 µg/ml (Promega) y 12 µl de 1M DTT (1.4 Dihiothreitol) (Fuka).
- 5) Incubar a 56° C en baño María durante 30-45 min.
- 6) Agitar vigorosamente con vortex durante 10 seg.
- 7) Hervir las muestras durante 8 min (perforar la tapa del microtubo Eppendorf para evitar que se abran).
- 8) Agitar vigorosamente con vortex durante 10 seg.
- 9) Centrifugar a 12.000 g durante 5 min a temperatura ambiente.
- 10) Obtener 100 µl del sobrenadante para PCR
- 11) Conservar las muestras a -20° C. Cuando se utilicen de nuevo, repetir desde el paso 8.

## APENDICE 11

### Extracción de ADN a partir de fluidos con Trizol

- 1) Por cada 0,25 ml de muestra adicionar 0,75 ml de Trizol LS Reagent (Gibco). Pasar la suspensión varias veces mediante micropipeta para lisar las células presentes. La relación Trizol / muestra siempre debe ser 3:1.
- 2) Incubar las muestras homogeneizadas durante 5 min a 15-30° C para permitir la disociación completa de los complejos nucleoprotéicos.
- 3) Adicionar 0,2 ml de cloroformo por cada 0,75 ml de Trizol LS Reagent utilizado en la homogenización inicial. Agitar los tubos vigorosamente durante 15 seg e incubar a 15-30° C por 15 min.
- 4) Centrifugar las muestras no más de 10.000 rpm durante 15 min a 4° C. En esta etapa quedan 3 fases: en la fase superior (fase acuosa) se encuentra el RNA, en la interfase proteínas y en la fase inferior, el ADN.
- 5) Remover cuidadosamente la fase superior (este paso es crítico para obtener una buena calidad del ADN) y precipitar el ADN con etanol. Se agregan 0,3 ml de etanol 100% por cada 0,75 ml de Trizol LS Reagent utilizado en la homogenización inicial y se mezcla por inversión.
- 6) Colocar las muestras a 15-30° C durante 3 min y sedimentar el ADN por centrifugación a 4.000 rpm durante 5 min a 4° C.
- 7) Remover cuidadosamente el sobrenadante. Lavar el pellet de ADN 2 veces con una solución 0,1 M de citrato de sodio en 10% de etanol. Usar 1 ml de esta solución por cada 0,75 ml de Trizol LS Reagent utilizado en la homogenización inicial.
- 8) En cada lavado se deja el ADN a 15-30° C durante 30 min en la solución de citrato de sodio y se mezcla con movimientos periódicos. Luego se centrifuga a 4.000 rpm durante 5 min a 4° C.
- 9) Resuspender el pellet de ADN en 2 ml de etanol 75% por cada 0,75 ml de Trizol LS Reagent utilizado en la homogenización inicial. Dejar 20 min a 15-30° C realizando movimientos periódicos y centrifugar a 4.000 rpm durante 5 min a 4° C.
- 10) Secar el pellet durante 10 min al vacío y disolverlo en NaOH 8 mM mediante pasaje lento a través de la pipeta (se adiciona 0,3 a 0,6 ml de NaOH 8 mM por cada 50-70 mg de tejido o  $1 \times 10^7$  células).