

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Vibrio fetus* venerealis, *Vibrio fetus* intestinalis y *Vibrio bubulus*

M.V.Z., FILADELFO URQUIZA R.¹
M.V.Z., M. A.. PABLO CORREA G.²

Resumen

Se investigó la presencia de gérmenes del género *Vibrio* en 58 muestras de semen fresco; 45 de lavados prepuciales y 20 de moco cervicovaginales. En 14 muestras (11.3%) se encontró *Vibrio bubulus*, en 4 muestras (3.2%) se aisló *Vibrio fetus* var. *venerealis* y en dos muestras se identificó *Vibrio fetus* var. *intestinalis*.

Los estudios recientes de Florent (1959 y 1963) y de Hoerlein (1970) permitieron diferenciar la existencia de 2 vibriosis genitales en bovinos, una vibriosis de origen venéreo causada por el *Vibrio fetus venerealis* y otra de origen intestinal producida por el *Vibrio fetus intestinalis*. La primera manifestada por esterilidad epizootica complicada con abortos; y la segunda caracterizada únicamente por abortos esporádicos en los bovinos, o enzoóticos en los borregos.

La Vibriosis bovina ha sido señalada por Frank, Bryner y Caruthers (1958) y por Hcerlein (1963 y 1970) como una de las principales causas de infertilidad temporal, caracterizada por dificultades en la concepción y muertes embrionarias.

En México, la importancia de la vibriosis es desconocida; Hidalgo (1965) aisló "una cepa de *Vibrio foetus venerealis* y 3 cepas de *Vibrio foetus bubulus*", al estudiar 50 muestras entre las que figuraron semen y fetos abortados. Dichas cepas fueron clasificadas mediante las pruebas de catalasa y ácido sulfhídrico (H₂S) no se determinó su crecimiento en presencia de NaCl y de glicina.

El objetivo del presente trabajo es aumentar el conocimiento de este problema, ya que los datos existentes en México, a la fecha, son

Recibido para su publicación el 10 de noviembre de 1971.

¹ Investigador del Depto. de Microbiología Experimental, Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, S.A.G., Km. 15^{1/2} Carretera México-Toluca, Palo Alto, D.F., México.

² Jefe del Depto. de Microbiología Experimental, I.N.I.P., S.A.G.

muy escasos. Esta enfermedad tiene una gran importancia económica en otros países; por ello, es urgente conocer más datos al respecto en México. Por otra parte, de acuerdo con Florent (1959) es necesario determinar el crecimiento de *Vibrio en* presencia de 3.5% de Cloruro de Sodio (NaCl), 1% de glicina y determinar la producción de H₂S para diferenciar, bioquímicamente, *V.f. venerealis* y *V.f. intestinalis*. En este trabajo se realizó esa diferenciación con miras a conocer si existían tales *vibrios* en nuestro medio.

Material y métodos

Como medios de cultivo para el aislamiento y la propagación se utilizó una combinación de los descritos por Plastridge, Stula y Williams (1964) y Shepler, Plumer y Faber (1963) consistente en placas de agar sangre adicionadas de bacitracina³ (2 U) *novobiocina*³ (2 Ug) y *polimixina*⁴ (1 U) por mililitro de medio de cultivo. Los medios líquidos utilizados fueron caldo tiol y caldo tioglicolato⁵.

Obtención de las muestras.—Se estudiaron 58 muestras de semen fresco, 45 de lavado prepucial y 20 de moco cervicovaginal. Fueron colectadas durante 1971 y procedían de los Estados de Puebla, México, Querétaro y Distrito Federal, y una muestra correspondió a un toro procedente de Chiapas. Las mues-

³ Upjohn Company.

⁴ Chaz Pfizer.

⁵ Laboratorios Difco.

tras de semen se obtuvieron mediante vagina artificial o con electroeyaculador y se conservaron en tubos de vidrio color ámbar a 4°C, las siembras se hicieron dentro de las 24 hr siguientes. Las muestras de moco cervicovaginal fueron colectadas utilizando pipetas para inseminación.

Los lavados prepuciales se hicieron con solución salina buffer; se colectaron de 20 a 30 ml de lavado prepucial, los cuales fueron centrifugados a 3,000 rpm, se desechó el sobrenadante y se sembró el sedimento, extendiéndolo con una asa de platino sobre el agar sangre, se incubó en una estufa para anaerobios⁶ a 37°C conteniendo atmósfera mezclada con 10% CO₂ y 65% N₂. Los cultivos se observaron diariamente del 3º al 6º días después de la inoculación. En esta misma forma se estudiaron las muestras de semen y moco cervicovaginal.

Identificación de los microorganismos.— Los gérmenes aislados fueron teñidos por el método de Gram y se les identificó en base a su morfología típica de bacilos curvados, en forma de S o unidos en forma de espiral.

La presencia de Catalasa se probó mezclando 4 ml de un cultivo en caldo tioglicolato con 1 ml de peróxido de hidrógeno al 3%, se consideró como reacción positiva la inmediata producción de gas.

Para comprobar la habilidad para crecer en presencia de NaCl se depositó 1 ml de caldo tioglicolato, conteniendo el microorganismo problema con 3 días de incubación, dentro de otro tubo con caldo tioglicolato al que se le agregó 3.5% de NaCl. La lectura se hizo 3 días después (Shepler, Plumer y Faber, 1963). La tolerancia para crecer en

un medio conteniendo 1% de glicina se comprobó en forma semejante.

La producción de H₂S se demostró sembrando las muestras en tubos conteniendo medio de triple azúcar hierro (TSI)⁵ (Kita, Ogimoto y Suto, 1966) e hidrógeno sulfurado, indol motilidad (SIM)⁵. Cualquier ennegrecimiento del medio se consideró como reacción positiva.

Resultados (Cuadro 1)

En 14 de las 123 muestras estudiadas (11.3%), se aisló el germen saprofita conocido como *Vibrio bubulus*; en 4 muestras (3.2%) se logró el aislamiento de un *Vibrio* catalasa positivo incapaz de crecer en presencia de 1% de glicina, 3.5% de NaCl y que no produjo H₂S, por lo cual se identificó como *Vibrio fetus venerealis*; en 2 muestras (1.6%) se aisló un germen catalasa positivo capaz de crecer en presencia de 1% de glicina, producir pequeñas cantidades de H₂S, e incapaz de crecer en presencia de 3.5% de NaCl, por lo que se identificó como *Vibrio fetus intestinalis*.

Es importante señalar que los gérmenes aislados tuvieron características culturales y bioquímicas similares a las descritas por Florent (1959) y a los tipos I, II y IV de Mohanty, Plumer y Faber (1962).

Los aislamientos de *Vibrio fetus venerealis* se hicieron a partir de una muestra de semen fresco de un macho adulto de raza Santa Gertrudis procedente del Estado de Chiapas y de 3 muestras de lavados prepuciales de 3 machos Holstein adultos procedentes del Estado de México; *Vibrio fetus intestinalis* de 2 muestras de lavados prepuciales procedentes de machos jóvenes de raza Holstein del D.F.; *Vibrio bubulus* de 6 muestras de semen

⁶ Modelo National 3640.

CUADRO 1
Características de las muestras y de los aislamientos

Espécimen	Núm. de muestras	<i>V.f. venerealis</i>	<i>V.f. intestinalis</i>	<i>V. bubulus</i>
Semen fresco	58	1 ^a	0	6
Lavado prepucial	45	3 ^b	2	8
Moco cervicovaginal	20	0	0	0
TOTALES	123 ^c	4	2	14

a Procedente de Chiapas.

b Procedentes del Edo. de México.

c Procedentes del Edo. de México. Pue., D.F., Qro. y Chiapas.

fresco y 8 de lavados prepuciales procedentes del Estado de Querétaro (Cuadro 1).

Discusión

En México se desconoce con exactitud la importancia económica de la Vibriosis. Sin embargo, si se considera que en un animal afectado aumenta el número de servicios por concepción, y que esto ocasiona gastos por concepto de alimentación, manejo y medicamentos aplicados a vacas improductivas, las pérdidas económicas resultantes serán considerables (Hoerlein, 1968a).

Las muestras de las cuales se lograron todos los aislamientos fueron el semen y los lavados prepuciales. La falta de aislamiento en el moco cervicovaginal puede deberse, tal vez, al reducido número de muestras trabajadas o a que, de acuerdo con lo descrito por Hoerlein y Carroll (1970), las hembras recuperadas de la infección desarrollan inmunidad que disminuye las posibilidades de aislar *Vibrio*. En el caso de los machos, Hoerlein (1970) recomienda como la técnica más eficiente, aquella en la que se utilizan vaquillas vírgenes para detectar a los toros infectados, después de que éstos les dan servicio.

Literatura citada

- BOKKENHEUSER, V., 1970, *Vibrio fetus* infection in man. Ten new cases and some epidemiologic observations, *Am. J. Epidem.*, 91:400-409.
- FLORENT, A., 1959, Les deux vibrioses genitales: la vibriose vénérienne due a *V. fetus (venerealis)*, et la vibriose d'origine intestinale due a *V. fetus intestinalis*. *Vlaams dierg. Tijdschr.*, Neded 3, N° 3, 60.
- FLORENT, A., 1963, A propose des vibrions responsables de la Vibriosis génitale des bovins et des ovins, *Bull. Off. Int. Epiz.*, 60:1053-1074.
- FRANK, A. H., J. H. BRYNER and B. CARUTHERS, 1958, A comparison of the effect of Catalase-Positive and Catalase-Negative Vibrios on the Fertility of Cattle, *Am. J. Vet. Res.*, January, 108-111.
- HIDALGO, M., 1965, Aislamiento y clasificación de *Vibrio foetus* de ganado lechero en México. *Resúmenes de la III Reunión Anual del Centro Nacional de Investigaciones Pecuarias, S.A.G.*, p. 8.
- HOERLEIN, A., 1963, Vibriosis in Range Cattle. Proceedings of the Sixty-seventh Annual Meeting, October 1963, *United States Livestock Sanitary Ass.*
- HOERLEIN, A., 1968, Bovine Vibriosis. *Animal Nutrition and Health*, May. p. 8.
- HOERLEIN, A., 1968a. Chapter III. Bovine genital Vibriosis. *In: Abortion Diseases of Livestock. Edited by L. C. Faulkner. Charles C. Thomas. Springfield, Illinois*, pp. 18-34.
- HOERLEIN, A. B. and CARROLL, E. J., 1970, Duration of immunity to bovine genital, Vibriosis, *J.A.V.M.A.*, 156, 6, 775.
- HOERLEIN, A., 1970, Vibriosis. *In: Bovine Medicine and Surgery. Chapter 2, Bacterial Diseases, First Edition, American Veterinary Publications. Inc. Illinois*, pp. 91-104.
- KITA, E., K. OGIMOTO and T. SUTO, 1966, Detection of *Vibrio fetus* from Bulls by means of fluorescent antibody techniques. *Nat. Inst. Anim. Health Quarterly*, Vol. 6, N° 4, pp. 223-232.
- MOHANTY, S. B., G. J. PLUMER and J. E. FABER. 1962, Biochemical and Colonial characteristics of some bovine Vibrios, *Am. J. Vet. Res.*, Vol. 23. N° 94, pp. 554-557.
- PI.ASTRIDGE, W., R. F. STULA and L. F. WILLIAMS. 1964, *Vibrio fetus* Infection and Reinfection in Heifers, as Determined by Cultural Tests Using Blood Agar Plus Antibiotics, *Am. J. Vet. Res.*, Vol. 25, N° 106, pp. 710-713.
- SHEPLER, V., C. J. PLUMER and J. E. FABER, 1963. Isolation of *Vibrio fetus* from Bovine preputial Fluid, Using Millipore Filters and an Antibiotic Medium, *Am. J. Vet. Res.* Vol. 24, pp. 749-755.

Los problemas de infertilidad, aborto ocasional y muertes embrionarias causadas por gérmenes del género *Vibrio* pueden evitarse con el uso extensivo de la inseminación artificial, en la que se utiliza semen con antibióticos de amplio espectro, y mediante el empleo de vacunas y bacterinas que proporcionan una sólida inmunidad (Hoerlein, 1968). Publicaciones recientes señalan que a la fecha se han notificado y confirmado en diversas partes del mundo, por lo menos 74 casos en la especie humana, de infección por *Vibrio fetus* (Bokkenheuser, 1970). La importancia de este microorganismo para la Salud Pública en México y las pérdidas que ocasiona a la ganadería, señalan la necesidad de realizar estudios más profundos encaminados a la solución del problema.

Summary

The presence of *Vibrio* was investigated in 58 samples of fresh semen, 45 of preputial washings and 20 of cervical mucus. *Vibrio bubulus* was found in 14 samples (11.3%) ; it was possible the isolation of *Vibrio fetus var. venerealis* in 4 samples (3.2%) ; *Vibrio fetus var. intestinalis* was isolated in 2 samples.