

EMPLEO DE LA TÉCNICA DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES PARA DIAGNOSTICO DE VIBRIOSIS GENITAL BOVINA EN MEXICO

M.V.Z. FRANCISCO SUÁREZ GÜEMES¹
M.V.Z. DIP. BACT. RICARDO FLORES C.^{1, 2}
M.V.Z. DIP. BACT. PH. D. CARLOS PIJOAN^{1, 3}

Resumen

Se colectaron 109 muestras de moco cérvico-vaginal de bovinos de diferentes razas, con problemas de infertilidad, procedentes de diversas regiones. Cada muestra se estudió por medio de la técnica de fluorescencia y solamente en un caso se logró aislar *Campylobacter fetus fetus*. Los resultados se discuten en el texto.

Introducción

La vibriosis genital bovina ha sido diagnosticada, por medio de estudios bacteriológicos, tanto en ganado productor de leche como en ganado productor de carne de diferentes regiones de la República Mexicana (Hidalgo, 1965; Urquiza y Correa, 1972; Flores y Ruiz, 1974).

La enfermedad tiene gran importancia económica para la ganadería, ya que puede causar infertilidad en más del 70% de los vientres en hatos infectados (Hoerlein *et al.*, 1964). En un estudio realizado en un hato de ganado productor de carne en el cual se diagnosticó vibriosis (Flores y Ruiz, 1974) se calculó que el control de la enfermedad produjo una ganancia estimada en \$272 000.00, cifra que demuestra la importancia económica del padecimiento.

El diagnóstico de la vibriosis genital bovina por medio de la técnica de anticuerpos fluorescentes se ha incrementado en varios países debido a que las muestras destinadas a esta prueba no requieren un manejo tan delicado como en el caso del diagnóstico bacteriológico. Esta prueba ha sido empleada con éxito por diversos investigadores (Mellick, Winter y McEntee, 1965; Taul y Kleckner, 1968).

Recibido para su publicación el 1° de julio de 1975.

¹ Departamento de Bacteriología, Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, SAG, km 15.5 Carretera México-Toluca, México, DF.

² Veterinary Virus Research Institute, Cornell University, Ithaca, NY. 14850.

³ Departamento de Ciencias Biológicas, Escuela Nal. de Estudios Profesionales. Cuautitlán, UNAM.

El objetivo del presente trabajo es establecer el empleo de la técnica de anticuerpos fluorescentes para diagnóstico de la vibriosis genital bovina en México y compararla con el diagnóstico bacteriológico.

Material y métodos

Preparación del conjugado

El conjugado se elaboró empleando la cepa 470-8221 RF de *Campylobacter fetus fetus*, la cual fue proporcionada por el National Animal Disease Laboratory de Ames Iowa, EE. UU. Esta fue inoculada por vía intravenosa y subcutánea a conejos para obtener un suero hiperinmune. A partir de éste se purificaron las globulinas y se conjugaron con isotiocianato de fluoresceína, siguiendo las técnicas descritas por Holborow y Johnson (1967), modificada por Pijoan (1973). El conjugado fue adsorbido con una suspensión de *Campylobacter sputorum bubulus* para eliminar posibles reacciones cruzadas.

Para la tinción de los frotis se utilizaron las técnicas descritas por Pijoan (1973).

Estandarización de la prueba

Se prepararon dos frotis de *Campylobacter fetus fetus*, uno de ellos se fijó durante diez minutos en etanol absoluto y el otro en acetona. Se tiñeron con gram y se observaron al microscopio. Esto se hizo con objeto de seleccionar el método más adecuado para fijar los frotis; resultó más efectiva la fijación con etanol absoluto.

Se evaluaron los posibles métodos que pu-

dieran emplearse para mantener en buenas condiciones los frotis hasta el momento de ser procesados y se encontró que el más eficaz era dejar que los frotis se secaran al aire y congelarlos inmediatamente a -20°C , hasta el momento de ser procesados.

Evaluación del conjugado

El conjugado se tituló preparando varios frotis de *Campylobacter fetus fetus*, los cuales se tiñeron con las diluciones 1:5; 1:10; 1:20 y 1:40 del conjugado, con el objeto de seleccionar la dilución mayor que presentara fluorescencia específica; ésta resultó ser la dilución 1:10. Posteriormente el conjugado, se evaluó en condiciones de campo empleando un frotis de moco cérvico-vaginal de una vaquilla previamente infectada con un cultivo vivo de *Campylobacter fetus fetus*. Siempre se encontraron resultados positivos, tanto a fluorescencia como al estudio bacteriológico realizado de manera simultánea. Durante las pruebas se usaron un control positivo de *Campylobacter fetus fetus* y un control negativo, *Campylobacter sputorum bubulus*.

Después de teñidos, se observaron con un microscopio de luz ultravioleta, Leitz, Orthopan, con filtro excitador BG12 de 3 μ y filtros de barrera de 510 o 530 μ de longitud de onda.

Colección de las muestras

Las muestras empleadas consistieron en moco cérvico-vaginal, el cual se obtuvo si-

guiendo la técnica descrita por Seger y Levy (1962). Se colectaron 109 muestras procedentes de ocho diferentes explotaciones localizadas en cuatro Estados de la República Mexicana (Cuadro 1). El estudio bacteriológico se realizó siguiendo la técnica señalada por Hoerlein y Kramer (1963).

Resultados

Los resultados de las 109 muestras de moco cérvico-vaginal estudiadas por la técnica de anticuerpos fluorescentes y comparados con el estudio bacteriológico se muestran en el Cuadro I.

Se puede observar que se obtuvieron 26 muestras positivas para la prueba de anticuerpos fluorescentes y en sólo una de éstas se logró el aislamiento de *Campylobacter fetus var. fetus*.

En todos los Estados de la República muestreados se encontraron animales positivos a fluorescencia. Con la excepción de Veracruz, en que ninguna de las 24 muestras fue positiva.

Discusión

Fue interesante el hecho de haber encontrado que, cuando la infección era reciente, como en el caso de la vaquilla infectada experimentalmente, se observó la presencia de células, aparentemente fagocitarias, que contenían en su interior a las bacterias. Estas

CUADRO I

Resultado de la prueba de anticuerpos fluorescentes y estudios bacteriológicos para diagnóstico de vibriosis genital bovina

Nombre y localización de los hatos	Número de muestras	Positivas a fluorescencia	Positivas a bacteriología
San Diego, Veracruz	13	0	0
La posta, Veracruz	11	0	0
El Pueblito, Qro.	12	8 (66.6%)	1 (8.3%)
Pastejé, Edo. de Méx.	27	2 (7.4%)	0
Cuautitlán, Edo. de Méx.	9	4 (44.4%)	0
C.I.P.E.S., Sonora	25	4 (16.0%)	0
El Gorgus, Sonora	9	5 (55.5%)	0
San Francisco, Sonora	3	3 (100.0%)	0
Total	109	26	1

células desaparecieron aproximadamente 45 días después de la infección.

Esta observación no es fácil de interpretar, pero puede indicar la relación que existe entre *Campylobacter fetus* var. *fetus* y su huésped. Es posible que el animal utilice la fagocitosis como primer mecanismo de defensa, el cual sería substituido por los anticuerpos secretores (Ig A), aunque éstos al parecer no son capaces de controlar la infección.

Esta relación huésped-parásito requiere más investigación antes de poderse definir con claridad.

El aislamiento del germen se realizó de una ganadería del Estado de Querétaro, la cual tenía ganado Santa Gertrudis. La historia clínica de este hato señaló que la fertilidad bajó considerablemente pocos meses después de que se introdujo al hato un semental de la misma raza, procedente del Sur de los EE. UU.

En una publicación de la Universidad de Colorado (Hoerlein *et al.*, 1964), se señala que esta enfermedad se encuentra ampliamente difundida en el ganado productor de carne de los estados de: Colorado, Utah, Nuevo México, Texas y Arizona. Esto permite suponer que el semental importado fue el que introdujo y diseminó la infección en el hato. De este dato se puede deducir la importancia que tiene la correcta evaluación del estado de salud de los animales de importación.

Las dos muestras que resultaron positivas a fluorescencia del rancho de Pastejé correspondieron a bovinos Angus, procedentes del Estado de Chihuahua. En éstos no se contaba con registros que permitieran establecer una historia clínica completa; sin embargo, ya que estos animales procedían de un estado fronterizo, donde la incidencia de esta enfermedad es alta, se puede suponer que los animales se infectaron en su lugar de origen.

Literatura citada

FLORES, C.R., y D.R. RUIZ, 1974, Diagnóstico y control de vibriosis en un hato de ganado productor de carne, *Resúmenes de la XI Reunión Anual, Inst. Nal. Invest. Pec.*, SAG, México.

HIDALGO, M.A., 1965, Aislamiento y clasificación de *Vibrio fetus* de ganado lechero en México, *Resúmenes de la III Reunión Anual, Cent. Nal. Invest. Pec.* SAG, México.

Las muestras de los animales de Cuautitlán procedían de explotaciones familiares, en las que se usaba un mismo toro para cubrir las vacas de diferentes hatos. De acuerdo con Hoerlein (1968), esta práctica favorece la diseminación de la enfermedad.

En los tres hatos muestreados en el Estado de Sonora se encontraron casos positivos a fluorescencia, confirmando la presencia de esta enfermedad en ganado de la región (Flores y Ruiz, 1974). En este Estado es común la introducción de pie de cría procedente del Estado de Arizona, y es probable que muchos de estos animales lleguen al país infectados de campilobacter.

El hecho de haber obtenido sólo un aislamiento, aun cuando 26 casos fueron positivos a fluorescencia, puede deberse a las características tan especiales que requiere el manejo de la muestra para el estudio bacteriológico. En caso de fluorescencia no requiere un manejo tan delicado, puesto que no es necesario mantener vivo al campilobacter. Sin embargo, algunos autores señalan reacciones cruzadas con el *Campylobacter fetus* var. *intestinalis*, lo cual da origen a diagnósticos falsos positivos. No sucede lo mismo con el estudio bacteriológico, puesto que al aislar el germen desaparecen las dudas en el diagnóstico.

Summary

Cervical mucus was collected from 109 head of cattle, in different farms with clinical history of infertility. The farms were located in 4 different states of Mexico. Each sample was tested by the Fluorescent Antibody technique as well as by bacteriological examination. In 26 cases, positive results were obtained by immuno Fluorescence and only in one case was *Campylobacter fetus fetus* isolated. The results are discussed in the text.

HOERLEIN, A.B., Bovine genital vibriosis, en: *Abortion diseases of livestock*, 1968, Editor, Faulkner, L.C., Ed. Charles C. Tomas Publisher, Illinois, USA, pp. 18-34.

HOERLEIN, A.B., and T. KRAMER, 1963, Cervical mucus for the diagnosis of vibriosis in cattle, *Jour. Amer. Vet. Med. Ass.*, 143(8):868-872.

HOERLEIN, A.B.; T. KRAMER; E.J. CARROL; W.

- BROWN, J.A. SCOTT, and L. BALL, 1964, Vibriosis in range cattle, *Jour. Amer. Vet. Ass.*, 144(2): 146-151.
- HOLBORROW, E.J., and G.D. JOHNSON, 1967, Immunofluorescence 1st Ed. en: Handbook of Experimental Immunology, Editor, Weir, D.M., Ed. Blackwell Scientific Publications Oxford and Edimburgh, p. 571-596.
- MELLICK, P.W.; A.J. WINTER, and K. McENTEE, 1965, Diagnosis of vibriosis in the bull by use of fluorescent antibody technique, *Cornell Vet.*, 55 (2):280-294.
- PIJOAN, A.C., 1973, Studies on Mycoplasma in relation to porcine respiratory disease. Thesis of Ph. D., University of Surrey, England.
- SEGER, C.L., and H.E. LEVY, 1962, Collection of bovine cervical mucus with insemination pipettes for the isolation of *Vibrio fetus*, *Jour. Amer. Vet. Med. Ass.*, 141:1064-1067.
- TAUL, L.K., and A.L. KLECKNER, 1968, Fluorescent antibody studies of *Vibrio fetus*: Staining characteristics.
- URQUIZA, R.F. y G.P. CORREA, 1972, Aislamiento e identificación de *Vibrio fetus venereal*, *Vibrio fetus intestinalis* y *Vibrio bubulus*, *Téc. Pec. Méx.*, 22:19-21.