

BAC

MODULO DIGITAL



El documento fuente se encuentra en
La Biblioteca Agropecuaria de Colombia

ELEMENTOS BIBLIOGRAFICOS

AUTOR (ES): Gómez Ospina, S.

AUTOR (ES) CORPORATIVO (S): Programa Univ. Nacional de Colombia /
Inst. Colombiano Agropecuario, Bogotá (Colombia).

TITULO: Evaluación de medios de cultivo y transporte para el
aislamiento de *Vibrio fetus*: estudio comparativo por cultivo e
inmunofluorescencia

LUGAR DE PUBLICACION: Bogotá (Colombia)

AÑO DE PUBLICACION: 1972

PAGINAS: 86 p.

INTRODUCCION

La vibriosis es una enfermedad venérea del ganado causada por Vibrio fetus, las vacas se infectan principalmente de dos maneras natural o artificial con un toro infectado. Los toros pueden infectarse durante la copulación con vacas infectadas.

El contacto del pene con secreciones infectadas de animales que previamente han sido servidos, puede ser considerado suficiente para producir la infección, los toros estabulados en un centro de inseminación artificial pueden infectarse de alguna otra manera.

La susceptibilidad de los toros jóvenes a la infección natural o experimental con Vibrio fetus es marcadamente más baja que en los toros viejos (mayores de cinco años). Estos son altamente susceptibles y retienen la infección permanentemente, esta susceptibilidad está relacionada con el aumento en número y tamaño de las criptas en el epitelio del pene⁸⁹. En las hembras la infección va seguida por un período de infertilidad, esto usualmente es el síntoma más predominante. Los ciclos estruales son irregulares y es probable que el aborto pueda ocurrir en cualquier estado de la preñez.

Clínicamente un hato con vibriosis no se puede diferenciar de un hato con trichomoniasis, en la mayoría de los hatos la infertilidad puede ser limitada a los animales que han sido apareados con toros infectados, cuando la infección ocurre previamente en un hato no expuesto esto tiende a ser severo debido al gran número de animales susceptibles³⁷.

Por la gran importancia que siempre se ha dado a la brucelosis, el problema de la vibriosis ha recibido poca atención sin tener en cuenta que este también trae grandes pérdidas económicas a la ganadería colombiana y por ende al país que la posea, igualmente desde el punto de vista de producción pecuaria este es un gran inconveniente para aumentar la natalidad pecuaria.

En vista de que el diagnóstico de la vibriosis no puede ser hecho solamente en base a la historia clínica del hato, sino que está debe ir acompañada por el aislamiento del agente causal, y que un solo aislamiento de Vibrio fetus var venerealis constituye un diagnóstico positivo de vibriosis en un hato; se estudió cual era el medio de cultivo más satisfactorio y que ofreciera la mayor confiabilidad posible.

Igualmente debido a la poca viabilidad que el Vibrio tiene en el medio usado (solución salina) para el transporte de las muestras del campo al laboratorio, se evaluaron dos medios de transporte, que remediaran en parte los problemas que tienen de recolectarlas y llevarlas oportunamente al laboratorio debido a las grandes distancias conque muchas veces tropiezan.

Se hizo también un estudio comparativo de técnicas por cultivo y anticuerpos fluorescentes para averiguar la posibilidad de usar esta última como una manera de diagnosticar la vibriosis.

REVISION DE LITERATURA

La vibriosis fue primero asociada con aborto en ovejas por McFadyean y Stockman⁵⁹, ellos reportaron un promedio de abortos de 23.2% y un promedio de esterilidad del 10% de hatos de ovejas infectadas por Vibrio fetus.

Durante el período de 1918 y 1923 Smith y sus asociados⁹⁵⁻⁹⁶ llamaron y establecieron el V. fetus como causa de aborto infeccioso en ganado.

Barger⁵ aisló V. fetus de un feto de cinco meses de edad y en el cual hubo retención de placenta, en adición a causa de aborto e infertilidad en ganado Moore⁶³ reportó que la infección por V. fetus es también causa de retención de placenta. Fuera de los casos humanos reportados por Plastrige⁷⁶. Según Spink⁹⁷ el V. fetus fue aislado de la sangre de tres mujeres, dos de las cuales abortaron. Bokkenheuser¹² reportó diez nuevos casos humanos en el estado de Nueva York, el organismo fue aislado mezclado con la flora normal del hombre.

De acuerdo con el manual Bergeys¹⁵ el V. fetus está clasificado así:

División I	Protophyta Sachs, 1874, Emend Krassillnikov, 1949
Clase II	Schizomycetes von Naegeli, 1857
Orden IV	Eubacteriales Buchanam, 1917
Familia VII	Spirillaceae Migula, 1894
Género	Vibrio Müller, 1773

Especie Vibrio fetus

El diagnóstico de la vibriosis bovina está basado a más de la historia clínica del hato por el aislamiento del agente causal en el laboratorio, el cual es uno de los principales, pruebas serológicas tales como inmunofluorescencia, la sero y muco-aglutinación, inoculación en animales de laboratorio o por el empleo de novillas vírgenes.

La identificación está basada en la morfología de la colonia, características de coloración, requerimientos de crecimiento, producción de catalasa, habilidad para crecer en cloruro de sodio al 3.5%, crecimiento en glicina al 1% y producción de H₂S.

Dufty²⁴ recomienda la centrifugación de la muestra a 1.200 x g por cinco minutos extender 0.5 ml de líquido sobrenadante sobre un agar sangre (él recomienda tres cajas por muestra) también tomar 0.5 ml a 1.0 ml de líquido sobrenadante y pasarlo a través de un filtro Millipore de 0.65 . Las cajas pueden ser examinadas a los tres y siete días.

El concluyó que si los cultivos tienen una alta contaminación, pueden ensayarse testigos. Las siguientes recomendaciones son dadas por Seamon⁹¹ para preparar cultivos de las muestras de Vibrio. En caso de cotiledones cortar pequeños pedazos de estos más o menos 0.5 g y macerarlos en un mortero, añadir 10 ml de solución salina fisiológica y hacer una emulsión luego esta es vaciada asepticamente dentro de un recipiente y se agregan 0.5 ml de solución salina estéril, el fluido es luego colocado en una in-

cubadora a 37 C por dos horas para que todas las células y residuos sedimenten, un mínimo de 2.0 ml del líquido sobrenadante es colocado dentro de una jeringa y se pasa a través de un filtro directamente sobre el agar triptosa conteniendo 10% de sangre de ovino.

Winter et al¹⁰³ sugiere que la técnica de filtración puede ser usada solamente si los intentos de aislamiento inicial fallan debido al crecimiento de muchos contaminantes que no son inhibidos en el medio con antibióticos. Algunos autores²⁴ dicen que la filtración por filtro Millipore puede ser útil para el aislamiento de V. fetus venerealis de muestras altamente contaminadas; el método se encontró ser acelerado aunque en ocasiones el bloqueo de los filtros parece que reduce la cantidad de filtrado y por consiguiente hay una reducción de Vibrio, esto puede ser usado en unión con otras técnicas en toros excretando pequeñas cantidades de V. fetus venerealis. Este mismo sistema de aislamiento del V. fetus fue realizado por Plummer et al⁷⁹.

Muchos medios de cultivo se han utilizado para el aislamiento, mantención y propagación a grande escala de gérmenes de V. fetus. Para la preparación de antígeno Jansen y Kunst⁴³ obtuvieron un buen crecimiento en embrión de pollo de siete a nueve días de edad en tres días de incubación. Se lograron fuertes crecimientos en caldo tioglicolato, más 3% de agar reemplazando el 10% de aire por CO₂^{43,44}. Kusdas y Morse⁵² describieron un medio semisólido con bilis de bovino, etil violeta y agar agar con antibióticos. Hasta 1949 todos los intentos que se hicieron para de-

sarrollar el V. fetus en medio sólido o en caldo fracasaron. Plastridge et al^{74,76} se idearon para la preparación de antígeno suspender la superficie de los medios semisólidos usando cuatro volúmenes de solución salina formalinizada, el agar se separaba por centrifugación a baja velocidad se agregaba suero más solución salina, filtrando luego por lana de vidrio y almacenando a 5 C este procedimiento no fué muy útil para la preparación de antígeno a grande escala.

Según Plastridge⁷⁷ el mantenimiento de cepas para la preparación de antígeno durante el período de 1941 a 1948 se hizo en un agar semisólido que consistía en una infusión de caldo más 0.3% de agar. El agar semisólido fue más tarde substituído por el medio thiol debido a los hallazgos de Hudleson⁴⁰ quien encontró que este medio daba mejores resultados para el crecimiento de Vibrio.

Para el aislamiento primario un medio conteniendo sangre o suero son superiores, agar sangre bovino fue el medio más comunmente usado, la sangre debe ser tomada de un animal que nunca haya estado infectado con V. fetus y que nunca haya dado positivo a la sero ni mucoaglutinación⁵³.

Una evaluación del método por filtración y el uso de medios con antibióticos fue realizado por Shepler et al⁹² ellos cultivaron muestras prepucciales utilizando el medio con antibióticos y filtrando a través de filtros Millipore. El medio con antibióticos fue una combinación de bacitracina (15U/ml) polimixina (1U/ml) y novibiocina (5mg/ml) se adicionaron al medio basal consistiendo en agar infuso de corazón y cerebro

más 10% de sangre de bovino, fue el medio más efectivo para el aislamiento de V. fetus de muestras prepuciales de bovinos, este medio con antibióticos eliminó el esparcimiento de Proteus y otros microorganismos pero Pseudomonas aeruginosa no siempre fueron inhibidas. Ni Proteus ni Pseudomonas interfirieron con el aislamiento de Vibrio cuando se usó la técnica de filtración. No se obtuvo crecimiento de Vibrio bubulus en medio con antibióticos pero; fue usualmente encontrado por la técnica de filtración. Ambos métodos aumentaron la posibilidad de aislar V. fetus de fluidos prepuciales. Los requerimientos de vitaminas y aminoácidos fue estudiado por Fletcher²⁹, usó varios medios pero no dió conclusiones claras, algunas vitaminas parecen estimular el crecimiento del V. fetus.

Winter et al¹⁰³ hicieron una evaluación de varios medios para el aislamiento de V. fetus, esos medios fueron: Agar sangre con y sin antibióticos. Usaron agar cistina corazón para preparar el medio usando los siguientes antibióticos: 24 U de Bacitracina y 20 U de micostatin. Agar Brucella. El medio fue preparado con 28 g de caldo Brucella 37.5 mg de glutatión y 20 g de agar disueltos en un litro de agua destilada. Medio de thiol semisólido 30 g de thiol y 4 g de agar fueron disueltos en un litro de agua destilada. Medio Brucella semisólido 28 g de caldo Brucella y 1.6 g de agar fueron disueltos en un litro de agua destilada. Algunos medios conteniendo 0.02% de cistina, 1% de glicina, 3.5% de cloruro de sodio. Ellos dicen que el medio conteniendo sangre y antibióticos es superior y mucho más efectivo que el cultivo de muestras filtradas.

Un trabajo similar fue realizado por Dunn et al²⁵, ellos compararon varios medios de cultivo: Agar cistina corazón, agar cistina corazón con 300 U de micostatin, 20 microgramos de albamicina y 2.5 microgramos de verde brillante. Medio thiol. Ellos concluyeron que el procedimiento más simple fue inoculado el medio thiol con semen filtrado. Un medio líquido conteniendo caldo, carne, peptona, hígado y 20% de suero de caballos fue utilizado por Alfimova² y aseguró una máxima rata de reproducción. El uso de muestras congeladas fue estudiada por Dufty²⁴ quien encontró que por este método el aislamiento de V. fetus es considerablemente reducido, sin embargo, él encontró una reducción de los contaminantes.

Keshava et al⁴⁵ usaron medio bacto thiol para primer cultivo de cepas de Vibrio y para la producción de antígeno, además para el crecimiento de Vibrio, el medio de Florent o una modificación fue usado. Los dos medios los cuales fueron usados dieron aproximadamente la misma posibilidad de aislamiento de V. fetus. Roberstad y Morrison⁸⁸ ensayaron un método de agitación constante para obtener mayor cantidad de células de Vibrio en más poco tiempo y encontraron las siguientes ventajas: Un mayor contacto de las células con los nutrientes, una remoción más eficiente de los productos tóxicos y un medio físico constante para cada célula.

Zemjanis Y Hoyt¹⁰⁷ estudiaron el efecto de varios factores en el crecimiento de V. fetus, utilizaron un total de 21 factores y encontraron

que estos aumentaron el crecimiento del Vibrio cuando se adicionaron al medio basal.

Estudio del efecto de 19 enzimas inhibitorias en varias concentraciones para V. fetus, Proteus y Pseudomonas fue estudiada¹⁰⁸ y encontraron que Pseudomonas es más resistente que Proteus vulgaris a algunas de las enzimas, esta diferencia de sensibilidad pudo ser utilizada para aislamiento de V. fetus, Pseudomonas aeruginosa de material contaminado con Proteus. Trueblood y Tucker¹⁰⁰ encontraron que cuando se adiciona fluido amniótico al agar Brucella en una concentración de 5% aumenta el crecimiento del V. Fetus.

Fletcher²⁹ utilizó para aislamiento de V. fetus y para otros vibrios microaerofílicos un medio semisólido compuesto por extracto de levadura 0.7%, cloruro de sodio 5%, agar 2% pH 8.0. Los principales aminoácidos encontrados en el extracto de levadura fueron ácido aspártico, ácido glutámico, glicina isoleucina, leucina, fenil alanina, treonina y valina que estimulan el crecimiento del Vibrio.

Firehammer²⁸ y Border en 1968 utilizaron para obtener un bacteriófago moderado de V. fetus un medio basal compuesto por caldo Brucella con adición de las siguientes sustancias 0.5% de extracto de levadura, 0.01% de cloruro de calcio y 0.1% de cloruro de magnesio.

Hansen³⁵ reportó que utilizando medio tioglicolato modificado de Brewer resultó ser altamente satisfactorio tanto para el aislamiento pri-

mario como para el mantenimiento de cultivos de Vibrio, los cultivos pueden mantener su viabilidad por muchos meses cuando se almacenan a temperatura del laboratorio.

Bryner y Frank¹⁶ describieron técnicas de laboratorio usadas para el aislamiento y propagación del Vibrio de la vagina, útero, placenta, fetos abortados de vacas, muestras prepuciales, semen y órganos genitales de animales al tiempo de la necropsia. Hörter³⁹ estudió la susceptibilidad a la neomicina de V. fetus, Pseudomonas, E. coli y otras bacterias y encontró que a una concentración de 0.005% son inhibidas cuatro cepas de Vibrio.

Mamedov⁵⁶ estudió la viabilidad del Vibrio en diferentes medios, el mejor resultado fue obtenido en tarozzi con 0.5% de glucosa y 20% de suero de ganado.

Agar hígado semilíquido, medio tioglicolato, medio de Brewer y caldo tarozzi sin azúcar fueron usados para aislamiento inicial de V. fetus obteniéndose mejor resultado en el medio tarozzi⁵⁰.

Munday et al⁶⁵ usaron el medio de thiol como medio de rutina en casos de abortos en Tasmania. Alfimova³ dice que el Vibrio puede desarrollarse en un medio líquido que contiene: carne, peptona, hígado y 20% de suero equino. El mejor crecimiento fue obtenido en un medio semilíquido con glicocóla.

El medio de cultivo utilizado por Hoerlein y Kramer³⁶ para el aislamiento de V. fetus de hembra fue agar cistina corazón con 10% de sangre de bovino desfibrinada, verde brillante 1:40.000 y 300 U de micostatin.

Mundt⁶⁶ utilizó para el diagnóstico de V. fetus y Trichomonas foetus de lavados prepuciales un medio especial que contiene peptona, fosfato de sodio, glutatión, glucosa, levadura, estreptomycin sulfato y una solución de Ringer modificada ajustando a un pH 7.4 con hidróxido de sodio al 10%. Él dice que ambos organismos sobreviven almacenados en el medio por 112 horas a temperatura de refrigeración, y por cuatro días a temperatura del laboratorio antes de ser incubados a 37 C.

O'Berry⁶⁹ hizo una comparación de fraccionamiento del suero. Utilizó etanol, sulfato de amonio y etoidina, él encontró que la comparación del conjugado preparado con suero fraccionado con sulfato de amonio fue superior a la de otros conjugados.

Mellick et al⁶⁰ hicieron un estudio para el diagnóstico de la vibriosis por la técnica de anticuerpos fluorescentes, los problemas principales encontrados fueron la fluorescencia no específica y detritos en muestras prepuciales coloreadas con el conjugado. Reacciones cruzadas en esta técnica fueron observadas con cepas de V. fetus venerealis y V. fetus instestinalis pero no con V. bubulus ni con otras 17 especies de bacterias probadas. Los resultados de este experimento indicaron que la prueba de anticuerpos fluorescentes es un método seguro para la detección de toros portadores de V. fetus.

Schmelpfenning y Mitscherlich⁹⁰ describieron un método simple y rápido para diferenciar V. fetus y Vibrio Eltor utilizando la técnica de anticuerpos fluorescentes. 71 cepas fuera de Vibrio y V. bubulus fueron diferenciadas.

Belden y Robertstad⁸ utilizaron la técnica de anticuerpos fluorescentes, ellos concluyeron que esta prueba es más sensible que la prueba de aglutinación y que se detectaron reacciones cruzadas entre cepas de V. fetus aisladas. La intensidad de fluorescencia fue dada de cero a cuatro cruces, la fluorescencia con conjugado normal y la inhibición de coloración usando un antisuero no marcado indicó la especificidad de la reacción.

Una comparación de inmunofluorescencia y técnicas de cultivo fue hecha por Winter et al¹⁰⁶ para la detección de V. fetus en muestras prepucales de toros. De 269 muestras de 145 toros, 202 fueron juzgadas negativas por ambos métodos. De los 67 diagnósticos positivos, 44 fueron obtenidos por ambos procedimientos, 12 por la técnica de inmunofluorescencia, y ocho solamente por métodos de cultivo.

Ambos procedimientos están sujetos a ciertas limitaciones y están considerados como satisfactorios para la demostración de animales portadores, aunque una demostración de los no portadores no puede ser establecida concluyentemente por ningún método en base a un solo resultado negativo. La complementación de estos dos procedimientos da una indicación de combinar su uso cuando sea posible.

Dufty²⁴ describió la siguiente técnica que él usó en el diagnóstico de la vibriosis bovina. Para la preparación del conjugado y el uso de isotiocianato de fluoresceína siguió la técnica descrita por Mellick et al⁶⁰, la mayor diferencia fue usando Sephadex G200 para la purificación final del conjugado en lugar de cromatografía de intercambio iónico.

La preparación de la muestra la hizo tomando 2 ml del líquido sobrenadante centrifugado a 2.700 x g por una hora, el sobrenadante fue descartando y el sedimento resuspendido en 0.2 ml de agua destilada, los frotis fueron hechos colocando 0.03 a 0.04 ml de cada muestra, secando al aire, fijando con etanol absoluto por 15 minutos, la lámina fue otra vez secada y 0.05 del conjugado fue colocado sobre el frotis e incubada a 37 C por 30 minutos en cámara húmeda. La lámina fue luego sumergida en una solución salina buferada por 20 minutos y luego cubierta con una solución bufer fosfato glicerol como líquido de montaje, a todas las láminas les hizo dos o más controles, la preparación fue luego examinada microscópicamente bajo luz ultravioleta por 40 minutos.

Usando esta técnica el autor concluyó que fue la más rápida y sensitiva de su experimento, ningún V. bubulus ni tres aislamientos de vibrios aeróbicos fueron coloreados y reacciones cruzadas no fueron observadas con bacterias aisladas de las muestras de lavados prepucciales de bovinos.

La tipificación de nuevas cepas de V. fetus por la técnica de anticuerpos fluorescentes fue sugerida por Kita⁴⁹. Ellas fueron divididas

en tres grupos, un grupo de cepas venereas solas y dos grupos de cepas intestinalis; el autor dice que la proporción de detectar V. fetus por este método fue casi el mismo que el obtenido por el método de cultivo utilizando un medio conteniendo compuestos químicos.

Taul y Kleckner⁹⁹ aplicaron la coloración por inmunofluorescencia para la identificación de V. fetus de semen bovino, descamaciones prepuciales. Ellos encontraron reacciones cruzadas entre V. fetus var venerealis y V. fetus var intestinalis, esto indicó que estas variedades de vibrios no pueden ser diferenciadas en base a inmunofluorescencia.

Reacciones cruzadas entre V. fetus y V. bubulus no se encontraron en este experimento; reacciones cruzadas con Staphylococcus aureus ocurrieron pero las formas cocoides pudieron ser fácilmente diferenciadas de cepas de V. fetus y su presencia no fue obstáculo para la interpretación.

La falta de coloración cruzada con las bacterias más comunes que se encuentran en el prepucio pueden no ser causa de interferencia en la interpretación. El problema de coloración no específica de espermatozoides y restos celulares fue reducida por fraccionamiento del suero hiperinmune con sulfato de amonio 1.56 M y por remoción del exceso de fluoresceína por filtración por gel en lugar de dialisis.

En 1968 la diferenciación de diferentes tipos de vibrios tanto patógenos como saprofitos fue sugerida por Polyakova⁸⁰. Los cultivos ferti-

les de Vibrio fueron divididos en dos serotipos, aunque de cada uno de estos serotipos se encontraron cepas con variaciones antigénicas. Especies saprofitas de Vibrio, Brucella, Listeria y Leptospira y las especies patógenas que causan aborto en ovejas no tuvieron afinidad serológica con vibrios patógenos. La presencia de varios serotipos dentro de las especies saprofitas se encontró V. bubulus. El uso de la técnica de anticuerpos fluorescentes hizo posible el diagnóstico de la vibriosis en material contaminado por otra flora o almacenado por 12 días.

Lein et al⁵⁴ examinaron 294 muestras de toros de nueve meses a siete años en un centro de inseminación artificial por inmunofluorescencia y métodos de cultivo como parte del programa de erradicación de la vibriosis, 67 (23.0%) de toros de tres años o más fueron portadores de V. fetus; V. bubulus fue aislado de 86% de los toros.

Algunos autores han reportado reacción cruzada entre Vibrio y Brucella entre ellos Morse et al⁶⁴ y también Robertstad⁸⁸, pero Kiggins et al⁴⁷ dicen que la infección por V. fetus no interfiere con la prueba de aglutinación para brucelosis y que la infección por Brucella abortus puede interferir en la prueba de aglutinación para vibriosis si el antígeno para V. fetus es preparado con cepas, las cuales poseen componentes antigénicos parecidos a los de Brucella abortus.

Ristic et al⁸⁵⁻⁸⁶ hicieron un estudio comparativo de las aglutininas en el moco cervical y en la sangre y encontraron que utilizando un antígeno preparado a partir de cepas aisladas de sus fetos abortados, los anticuerpos en el moco cervicovaginal persistieron por un período más largo que los anticuerpos del suero. La prueba de aglutinación del moco persistió positiva por un período de 70 a 182 días. Las pruebas de aglutinación del suero persistieron positivas por un período de 24 a 54 días seguidos del aborto.

Winter¹⁰⁴ demostró anticuerpos para Vibrio en ganado normal de diferentes edades. Los anticuerpos contra V. fetus fueron semejantes a los anticuerpos descritos por otras endotoxinas de otras bacterias Gram negativas, en su especificidad, uniformidad, distribución y concentración en el suero. El reportó que con la presencia de V. fetus en el toro no se observan cambios detectables en la calidad o cantidad de anticuerpos.

Una prueba hemolítica fue realizada por Ristic y Walker⁸⁷ y concluyeron que esta prueba es superior a la prueba de aglutinación en tubo y tiene la habilidad de detectar pequeñas cantidades de anticuerpos. Sustancias antigénicas por acidificación de un filtrado libre de células a un pH 3.2 fue aislado por Nageswararac y Blosbell⁶⁸.

Hoerlein et al³⁸ probaron bacterinas de V. fetus con adyuvante en ganado infectado experimentalmente y en hatos infectados por vibriosis bovina. Ellos dicen que estas bacterinas pueden ser usadas satisfacto-

riamente para la protección de hatos no infectados o los expuestos a la infección por otros hatos. Firehammer y Berg²⁷ también utilizaron una bacterina emulsificada en aceite mineral y encontraron que la rata de concepción alcanzada fue de 91.5% en 353 vacas vacunadas comparada con la rata de concepción de 45.5% en 407 vacas controles.

Cambios de la sensibilidad antigénica en cultivos viejos fue estudiada por Biberstein¹⁰ y encontró en estos gran disminución en dicha sensibilidad. Plastridge⁷³ concluyó que la prueba de aglutinación es de valor en el diagnóstico del aborto y puede determinar una posible infección en un hato. Aycardi⁴ reportó que el diagnóstico serológico puede ser usado en un programa de erradicación o tratamiento general de hatos pero no en animales individuales dentro de esos hatos debido a la naturaleza transitoria de la reacción.

Kaylov⁴⁶ reportó que el método de microaglutinación con el uso de un suero de tipo específico es simple y ofrece la posibilidad de diferenciar cultivos del agente causal de la vibriosis de los vibrios no patógenos en 20 y 30 minutos.

Un lipopolisacárido aislado de una cepa de V. fetus venerealis por Winter¹⁰⁵ fue ensayada intradérmicamente en conejos sin obtener ninguna reacción.

Transmisión experimental de V. fetus ha sido estudiada en animales de laboratorio tales como crisetos, curfés⁸⁴ y ratas preñadas⁷¹ utili-

zando la vía tanto intravaginal como intraperitoneal encontrándose una mejor respuesta de aglutininas en el suero cuando se usaba la vía intraperitoneal. También se han hecho estudios para verificar la patogenicidad del V. fetus utilizando huevos embrionados de 7, 8, 9 y 12 días de edad y han encontrado⁴⁴⁻² las mismas lesiones encontradas en la placenta de fetos bovinos abortados igualmente una excelente multiplicación del Vibrio en el fluido alantóico y en la mayoría de los casos la muerte de embrión más o menos a las 72 horas. Este sistema no es recomendado por los autores para aislamiento de V. fetus de material altamente contaminado.

McEntec y Hughes⁵⁸ inseminaron novillas vírgenes con semen de toros infectados, el título del moco vaginal vino positivo aproximadamente 60 días después del servicio con semen infectado, la mayoría de las novillas infectadas tuvieron ciclos estrales largos de 27 a 53 días término medio 32 días. Similar experimento fue realizado por Clark et al²¹⁻²².

Adler et al¹ concluyeron que la prueba bacteriológica o serológica para detectar infección por V. fetus en toros no es adecuada, ellos sugieren inseminar novillas vírgenes con semen de toros sospechosos y examinar el moco vaginal para la presencia de aglutininas específicas y esto debe hacerse 30 y 50 días después de la inseminación.

Winter et al¹⁰³ encontraron que las colonias de V. fetus en agar Brucella eran típicamente redondeadas, translúcidas con una superficie lisa. Varias variantes de colonia fueron encontrados por Bond¹⁴ varian-

tes lisas, rugosas y mucosas. Bryner et al¹⁸ en su estudio de disociación de vibrios del tracto genital bovino, encontraron que el tipo I presentaba una colonia lisa y cuatro variantes, tipo II ocurrió en forma de colonia lisa y ocho variantes, el subtipo I ocurrió en colonias lisas y colonias como vidrio esmerilado y los cultivos siguientes fueron estables, el V. bubulus ocurrió en tres tipos de colonias lisas y cuatro variantes más.

En cultivos jóvenes, V. fetus tiene forma de coma o de ese, midiendo de 0.2 a 0.5 μ de ancho, 155 μ de largo, en cultivos viejos algunas formas se aproximan a otras formando grandes espirales que pueden atravesar todo el campo abarcado por el objetivo de inmersión.

Tanto en cultivos jóvenes como en los viejos se observan granulos tingibles por el azul de toluidina al 1% o por el método de Wright o Giemsa y localizados en uno de los polos de la bacteria. El germen se mueve gracias a un solo flagelo polar, no producen capsula ni esporas, V. fetus se tifie intensamente con el azul de metileno alcalino⁶¹.

Cultivos de V. fetus de origen bovino requieren ambos oxígeno y CO₂ para el crecimiento⁸²⁻⁵⁷. La mayoría de las cepas son microaerofílicas aunque algunas pueden crecer aeróbicamente cuando se adaptan a condiciones de laboratorio. Fletcher²⁹ cultivó el V. fetus de toros y ajustó la atmósfera a 2.5% de oxígeno, 5% de CO₂ y 92.5% de nitrógeno.

Clark²¹ cultivó las cepas a 37 C bajo una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de nitrógeno. Firehammer y Border²⁶ cultivaron las cajas en 10% de CO₂ o en una mezcla especial de gases 90% de nitrógeno, 5% de CO₂ y 5% de oxígeno. Una atmósfera conteniendo aproximadamente 40% de nitrógeno y 10% de CO₂ fueron utilizadas por Keshava et al⁴⁵.

Reich et al⁸¹ comprobaron que el crecimiento del Vibrio de origen bovino aumentaba al disminuir la tensión de oxígeno por debajo de la del aire corriente pero la relación entre las diferentes concentraciones de oxígeno y CO₂ faltaba por determinar, por lo cual Kiggins y Plastridge⁴⁸ estudiaron 34 cepas diferentes de Vibrio y comprobaron que todas necesitaban CO₂ y oxígeno y que el crecimiento óptimo lo lograron en una atmósfera que contenía 5% de oxígeno y 10% de CO₂ añadiéndose en un vacío parcial o bien con hidrógeno o nitrógeno siendo más práctico utilizar el nitrógeno que quede en una concentración de 85%.

Para determinar la actividad de la catalasa del Vibrio se usa una variante de la prueba de la catalasa en la forma descrita por Blom y Christensen¹³ o sea midiendo un milímetro el desplazamiento del líquido por el gas, utilizando agua oxigenada al 3%.

Jakovljevic y Beattle⁴² detectaron que hay diferencia en la actividad de catalasa entre diferentes tipos de crecimiento, esto fue observado utilizando agar semisólido a diferentes concentraciones, la más importante conclusión de este experimento fue que algunas cepas de Vibrio pueden ser clasificadas como muy patógenas o no dependiendo del sitio del

crecimiento examinado.

Frank et al³¹ hicieron una comparación de vibrios catalasa positivos y negativos, ellos reportaron que vibrios catalasa positivos no son aislados de toros ni novillas vírgenes, este es transmitido de un toro infectado a novillas susceptibles y de novillas infectadas a toros susceptibles. La mayoría de toros infectados con vibrios catalasa negativos ha dado satisfactorios records de crianza en contraste con los infectados por vibrios catalasa positivos, esto fue similar a lo observado por Bryner y Frank¹⁷.

Leing⁵³ utilizó para la producción de H₂S un medio compuesto de peptona 10 g, cloruro de sodio 5 g, infusión de carne 1.000 ml y tiras impregnadas en acetato de plomo. Un apreciable ennegrecimiento de la tira en 24 horas fue considerado como positivo. Dunn et al²⁵ detectaron la producción de H₂S por insertar tiras de acetato de plomo dentro de tubos de albúmina o thiol y observando por cinco días. Medio de triple azúcar hierro¹⁰³ y medio sim⁹ también ha sido utilizado.

Firehammer y Berg²⁶ utilizaron para esta prueba un medio semisólido conteniendo 0.02% de cisteína.

Park et al⁷⁰ chequearon 72 cepas de V. fetus catalasa positivos y los dividieron en dos grupos en base a la producción de H₂S y tolerancia a la glicina, las dos cepas de V. fetus fueron venerealis e intestinalis. V. fetus var venerealis no crece en medio conteniendo 1% de

glicina lo cual si lo hace V. fetus var intestinalis²⁶.

Chang y Ogg²⁰ observaron fenómenos de transducción y mutación de caracter tolerancia a la glicina utilizando un donador glicina negativo y un receptor glicina positivo, ellos dicen que la característica tolerancia a la glicina no puede ser segura para separar el agente etiológico del aborto vibriónico en el ganado, ovejas y humanos dentro de las variedades intestinalis y venerealis, igual a lo reportado con respecto a cepas Vibrio resistentes a la estreptomycin²³, la acción de la penicilina y glicina no pueden contarse para la separación de las cepas venéreas e intestinalis por estas sustancias³².

La prueba de tolerancia al cloruro de sodio al 3.5% fue estudiada 42, 99, 52.

Mahanty et al⁶¹ separaron los cultivos de V. fetus en tres tipos así: Tipo I catalasa positivo H₂S negativo no tolera glicina 1%, tipo II catalasa positivo, trazas de H₂S y tolera la glicina al 1%, tipo III catalasa positivo, trazas de H₂S pero no toleran la glicina al 1%. El V. bubulus fue clasificado en el tipo IV y es catalasa negativo, produce abundante H₂S y tolera cloruro de sodio a una concentración del 3.5%.

Smibert^{93,94} clasificó el V. fetus var intestinalis en base a su crecimiento en condiciones aeróbicas, anaeróbicas y en jarras conteniendo 16% de oxígeno, hidrólisis gelatina y caseína, hidrólisis de hipurato de sodio y esculina y habilidad para utilizar carbohidratos.

Winter et al¹⁰³ reportaron que los criterios para clasificar V. fetus son: presencia de características coloniales, morfología celular y la producción de catalasa. Otro método utilizado para la identificación de V. fetus fue estudiado por Firehammer y Berg²⁶ y fue en base a tolerancia a la temperatura, ellos dicen que V. fetus var venerealis como causa de infección y esterilidad en ganado es completamente intolerante a crecer a 42 C, ellos dicen que esta prueba es de valor pero tiene ciertas limitaciones.

Basden et al⁷ concluyeron que las pruebas bioquímicas y serológicas no son suficientes para clasificar bacterias clasificadas como vibrios, dicen que deben hacerse pruebas bioquímicas y análisis de la composición de las bases del DNA y detección de la homología del ácido nucleico, el aislamiento bovino el cual tuvo diferencia substancial en el porcentaje de guanina y el de citosina mostró ser genéticamente diferente de las sobrantes cepas de Vibrio.

Berg et al⁹ hicieron la siguiente clasificación del V. fetus en base a pruebas bioquímicas y serológicas así: Grupo A-1 (serotipo A biotipo 1) glicina negativo H₂S negativo; Grupo A sub 1 (serotipo A biosubtipo 1) glicina negativo H₂S positivo; Grupo A-2 (serotipo A biotipo 2) glicina negativo H₂S positivo; Grupo B (serotipo B) y Grupo C (serotipo C).

En los dos primeros grupos estan incluidas las cepas venereas, y en los tres restantes las cepas de V. fetus var intestinalis; de las cepas de V. fetus var intestinalis que fueron capaces de transferir enfermedad venérea y vivir en el tracto genital del ganado fue el sero-tipo B.

Ringen y Frank⁸³ usaron un medio para diferenciar V. fetus y V. bubulus, el medio basal fue agar Brucella adicionandole 0.1% de FeSO₄·H₂O. Mohanty et al⁶² dicen que el V. bubulus (tipo IV) los cultivos son catalasa negativos, producen abundante H₂S y crecen en presencia de cloruro de sodio al 3.5%.

El Vibrio sputorum aislado comunmente de residuos gingivales humanos no produce catalasa y es capaz de crecer anaeróbicamente, y no crece en 3.5% de cloruro de sodio⁵⁵. Kundas y Morse⁵¹ estudiaron ciertas actividades fisiológicas y características de crecimiento de 66 cultivos de vibrios patógenos y no patógenos. Todos los cultivos fueron catalasa positivos excepto ocho cepas de vibrios las cuales fueron aisladas de la mucosa vaginal y secreciones bovinas.

Doza²³ hizo un estudio relacionado con el efecto del V. bubulus sobre el endometrio bovino y encontró que los cambios histopatológicos fueron mínimos y envolvian principalmente la superficie del epitelio, estroma y glándulas uterinas y encontró que la infección por V. bubulus disminuye la actividad fosfatasa alcalina en el endometrio.

MATERIALES Y METODOS

Cepas Vibrio fetus

Para realizar este experimento se utilizaron tres cepas de V. fetus las cuales habían sido aisladas en el laboratorio de Microbiología del Laboratorio de Investigaciones Médicas Veterinarias (LIMV) del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). De muestras de campo, tanto de lavados prepuciales como de fetos abortados e identificadas con los números 079, 138, 145 y clasificadas por pruebas bioquímicas tales como: actividad de la catalasa, producción de ácido sulfhídrico, prueba de tolerancia a la glicina al 1.0% y al cloruro de sodio al 3.5% que se describen a continuación:

Actividad de la catalasa. La determinación de la actividad de la catalasa se hizo con un cultivo de V. fetus en medio de thiol después de una incubación de 48 horas a 37 C en una atmósfera que contenía 10% de CO₂ siguiendo una modificación en la forma descrita por Blom y Christensen¹⁴. Se determinó primero el crecimiento y pureza del cultivo y a continuación se añadió a este una solución de agua oxigenada al 3% (preparada mezclando una parte de agua oxigenada comercial al 30% en nueve partes de agua destilada) utilizando un volumen equivalente al del medio.

La tapa del tubo se sustituyó por un tapón especial el cual estaba provisto de un tubo capilar, se invirtió la posición del tubo marcandose con un lápiz de cera el nivel del contenido, se agitó varias veces y se

dejó invertido por 20 minutos tiempo en el cual se leyó en mm el volumen del líquido desplazado por el gas y se anotó este dato como actividad de la catalasa.

Producción de ácido sulfhídrico. Para determinar la producción de H_2S se utilizaron dos pruebas⁹. La primera, la llamada prueba insensitiva para la cual se utilizó el medio de SIM, y la segunda la prueba sensitiva en la cual se utilizó un medio que contiene 0.02% de cisteína, insertándose en cada tubo una tira de papel de filtro impregnada en una solución saturada de acetato de plomo. Una reacción positiva se manifiesta por ennegrecimiento de la tira, la reacción fue observada a las 24, 48 y 72 horas de incubación a 37 C bajo una atmósfera de 10% de CO_2 .

Todos los inóculos anteriores se hicieron a partir de un cultivo de V. fetus en medio de thiol y otros a partir de cultivos en medio sólido, todos los cultivos fueron incubados a 37 C en una atmósfera que contenía 10% de CO_2 por un período de 72 horas.

Medios de cultivo. Se estudiaron cinco medios de cultivo para buscar cual favorecía mejor el crecimiento del V. fetus y mostraba una mejor inhibición de los contaminantes que se encuentra comunmente en la cavidad prepuccial de los bovinos; dichos medios fueron: agar Brucella, agar cistina corazón, agar infuso de corazón y cerebro*.

* Difco Laboratorios, - Detroit, Michigan.

Medio Florent

Extracto de carne	5 g
Peptona	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 ml

Medio Florent Modificado

Tioglicolato	24 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 ml

A todos los medios anteriormente citados, se les agregó antes de su esterilización 0.3% de thiol; después de la esterilización y cuando la temperatura bajó a 45 C se le agregó verde brillante a una concentración final de 1:50.000 y sangre desfibrinada al 10%. A todos se les hizo prueba de esterilidad incubándolos por 48 horas a 37 C y se almacenaron a 4 C antes de su uso.

Para el mantenimiento de las cepas y su clasificación bioquímica se utilizaron los medios de thiol y medio tioglicolato de Brewer (Difco).

Medio Brucella semisólido (Difco). Se preparó pesando 10 g de agar Brucella, 0.5% de extracto de levadura en un litro de agua destilada y esterilizando en tubos. Este medio se usó para hacer las respectivas clasificaciones bioquímicas; se prepararon varios lotes de tubos los cuales contenían glicina al 1%, cloruro de sodio al 3.5%, cisteína al 0.02%.

Purificación de cepas. La purificación de las cepas se hizo en agar sangre al 10% sin ninguna sustancia inhibitoria y se inocularon huevos embrionados de siete, ocho y nueve días de incubación por vía corialantoidea con 0.1 ml de cultivo de V. fetus. Estos fueron inoculados en la forma descrita por Webster¹⁰¹.

Los cinco medios antes mencionados fueron estudiados para saber cual favorecía mejor el crecimiento del V. fetus. Se usó un cultivo estándar de V. fetus utilizando diferentes diluciones desde 10^{-3} a 10^{-5} . Estas diluciones fueron hechas en caldo tioglicolato sembrando cada dilución en cantidad de 0.1 ml a cada uno de los medios a estudiar y usando tres cajas por cada dilución.

Para saber cual mostraba mejor inhibición de contaminantes comúnmente encontrados en la cavidad prepucial, se hicieron también diluciones a partir de un lavado prepucial conocido, positivo a V. fetus; este fue procesado en la siguiente forma: el lavado se centrifugó a 3.500 rpm (7.146 x g) durante 20 minutos, se descartó el líquido sobrenadante y a partir del sedimento se hicieron las respectivas diluciones en caldo tio-

glicolato 10^{-2} a 10^{-4} , sembrando también tres cajas por cada dilución de cada uno de los medios a estudiar; el sedimento fue también sembrado en los respectivos medios sin diluir.

Todas las cajas fueron incubadas a 37 C por 72 horas en una atmósfera que contenía 10% de CO_2 , el recuento de las colonias se hizo en un cuenta colonias*.

Medios de transporte. Para el transporte de muestras del campo al laboratorio se ensayaron dos medios.

Medio tioglicolato el cual fue preparado pesando 40.5 g de tioglicolato en un litro de agua destilada, antes de su esterilización se repartió en frascos de 250 ml en cantidad de 150 ml y se esterilizó en el autoclave. Se le hizo prueba de esterilidad por un período de 48 horas a 37 C y luego se almacenó a temperatura ambiente antes de su uso.

Medio recomendado por Mundt⁶⁶ el cual se modificó en la siguiente forma: se preparó una solución de Ringer como sigue:

Cloruro de sodio (NaCl)	7 g
Cloruro de calcio (Cl_2Ca)	0.3 g
Cloruro de potasio (ClK)	0.25 g

* Spencer, American Optical Company.

Estas sales se disolvieron en un litro de agua destilada y a esta solución se le adicionaron las siguientes sustancias:

Peptona	10 g
Fosfato de sodio	1 g
Glutation	0.5 g
Glucosa	2.5 g
Extracto de levadura	6 g

Esta mezcla se calentó hasta disolución completa, se ajustó el pH a 7.4 usando una solución de hidróxido de sodio al 10%. El medio se repartió en frascos de 250 ml en cantidad de 150 ml y se esterilizó en el autoclave; se le hizo prueba de esterilidad por un período de 48 horas a 37 C y se guardó tanto a temperatura ambiente como en refrigeración y antes de su uso se le adicionaron 50 unidades de sulfato de polimixina y 550 unidades de bacitracina.

La eficacia de los medios se estudió primero infectando experimentalmente un bovino de tres años de edad, raza Holstein con cepas de V. fetus var venerealis y se comprobó su eficacia analizando un total de 100 muestras procedentes de diferentes hatos tanto de la Sabana de Bogotá como fuera de ella.

Infeción experimental del bovino. Se preparó un inóculo que contenía aproximadamente 3×10^8 células del Nefelómetro estandar 10 en medio de tioglicolato, se diluyó este en 90 ml de caldo de tioglicolato,

se homogenizó bien el inóculo y se pasó a un frasco estéril de 250 ml.

Se lavó muy bien con agua y jabón el orificio externo del prepucio, se introdujo un tubo de caucho estéril por este orificio y a ésta se adhirió un venoclisis también estéril, este se conectó al frasco que contenía el inóculo y una vez el líquido en la cavidad prepucial se hicieron masajes fuertes durante 30 minutos; se dejó el toro en reposo por 30 minutos y luego se hizo otro masaje por 20 minutos más.

Toma de muestras. A los quince días después de haber sido infectado el toro se tomó una muestra para comprobar la infección en el animal y comprobado esto se tomaron las siguientes muestras:

Lavados prepuciales. Se utilizó la técnica de Sierra Fernández* que consiste en hacer orinar completamente el animal y esquilarse si es necesario, lavar muy bien con agua y jabón el orificio externo del prepucio, secarlo bien e introducir un tubo de caucho estéril de poca flexibilidad de aproximadamente 30 centímetros por este orificio, atar el orificio prepucial con una banda de caucho sujetándolo con una pinza hemostática, luego el tubo se conecta a un venoclisis también estéril el cual se adhiere al frasco que contiene el medio con el cual se va a hacer el lavado, Figura 1. Se deposita todo el líquido en la cavidad prepucial y se sujeta el otro extremo del tubo con una pinza hemostática para impedir la salida del líquido.

* Comunicación personal. Sierra Fernández Plinio (1970). Laboratorio de Investigaciones Médicas Veterinarias (ICA).

Se hacen masajes de abajo hacia arriba por espacio de 20 minutos, teniendo la precaución de que otra persona haga presión sobre la uretra para evitar que el toro orine en el momento en el cual se esté haciendo el lavado, Figura 2. Se recoge luego el material en el mismo frasco, se identifica muy bien la muestra para ser llevada al laboratorio. También se tomó esta misma muestra siguiendo el método descrito por Bartlett⁶.

Muestras de semen. Estas se tomaron por medio de electroeyacuación.

Raspado de pene. Se hizo en la forma descrita por Gibson et al³³ o sea produciendo la protrusión del pene utilizando un electroeyaculador, frotando vigorosamente el pene con un aplicador plano hasta producir descamación.

Procesamiento de las muestras. Los lavados prepuciales se centrifugaron a 3.500 rpm (7.146 x g) durante 30 minutos, se sembró tanto del sedimento como del sobrenadante tres cajas por cada muestra. Una vez procesados los lavados prepuciales se repartieron en frascos pequeños y se dejaron a diferentes temperaturas así: temperatura del laboratorio aproximadamente 19 y 20 C; refrigeración más o menos a 4 C y congelación a -20 C. Se siguieron procesando cada 24 horas en forma sucesiva hasta el momento en el cual no se observó crecimiento de V. fetus. Se dejaron dos muestras en congelación y la una se descongeló a 37 C y la otra a temperatura ambiente.

Las muestras de semen y de raspado de pene se recolectaron en los mismos medios y fueron procesadas en igual forma que los lavados prepucciales.

Después de haber estudiado un total de 41 muestras del bovino infectado experimentalmente y conocida ya la viabilidad que dichos medios proporcionaban al V. fetus conservándose las muestras a diferentes temperaturas, se procedió a estudiar los mismos medios de transporte (el tioglicolato y el medio modificado de Mundt) pero ya en muestras de campo de diferentes hatos tanto de la Sabana de Bogotá como FUERA de ella.

Se estudiaron un total de 100 muestras repartidas en 77 lavados prepucciales, 15 muestras de semen y 8 secreciones vaginales, el proceso seguido con dichas muestras fue exactamente igual al seguido con las muestras tomadas del bovino infectado experimentalmente.

Anticuerpos fluorescentes. Cepas de V. fetus mantenidas en medio tioglicolato y las cuales habían sido aisladas de fetos bovinos y de lavados prepucciales fueron utilizadas para inmunizar conejos. Del medio tioglicolato fueron sembradas en agar sangre y después de tres días de incubación a 37 C en una atmósfera que contenía 10% de CO₂ fueron examinados para confirmar su pureza teniendo en cuenta la morfología de la colonia y características morfológicas observadas con la coloración de Gram.

Las células fueron colectadas en solución salina fisiológica que contenía formol al 3%; se hicieron dos suspensiones de células que correspondieron la primera a una dilución de 3×10^8 y la segunda 2.7×10^7 del Nefélómetro estandar 10 y 8 respectivamente¹¹. Se inmunizaron tres conejos de aproximadamente cinco libras de peso. Los conejos recibieron simultáneamente una mezcla de 1.0 ml de la dilución de células con 1.0 ml del Adyuvante de Freund completo, se inocularon 0.25 ml en cada miembro vía intradérmica y 1.0 ml fue repartido en pequeñas dosis en el dorso también vía intradérmica.

De los tres conejos dos recibieron dosis intravenosas ascendentes con la primera dilución de células por un período de diez días y con cuatro días de intervalo así: día primero y segundo 0.1 ml, día tercero 0.2 ml, día cuarto 0.4 ml, día quinto y sexto 0.6 ml, día séptimo y octavo 0.8 ml, días noveno y décimo 1.0 ml.

Estos dos conejos fueron sangrados diez días después de la última inoculación por vía cardíaca. El otro conejo fue inmunizado con la segunda dilución utilizando las mismas dosis pero con intervalos de tres días y fue sangrado siete días después de la última inyección también por vía cardíaca.

A cada uno de los sueros se les hizo prueba de aglutinación utilizando diluciones de factor cinco obteniéndose aglutinación completa en la dilución 1:3.125.

Preparación del conjugado. La fracción globulínica fue obtenida por precipitación del suero con sulfato de amonio saturado siguiendo la técnica de Goldstein et al³⁴ o sea que todos los sueros fueron fraccionados a 6 C utilizando solución saturada de sulfato de amonio al 50%, adicionando un volumen de salina y 1.33 volúmenes de sulfato de amonio saturado frío. El precipitado fue separado en una centrifuga refrigerada y luego se lavó dos veces más con solución saturada de sulfato de amonio al 40%. El precipitado fue suspendido en solución salina y dializado por 72 horas en la misma solución, con el fin de remover los iones sulfato.

El contenido de proteína fue determinado usando un refractómetro*. La fracción globulínica fue marcada con Isotiocianato de Fluoresceína (0.05 mg por mg de proteína) siguiendo el procedimiento de Marshall⁶⁷, o sea que la proteína para marcar se diluyó con una solución tamponada 0.15 M carbonato bicarbonato (pH 9.0) hasta obtener una solución al 10%.

El conjugado fue pasado a través de una columna de Sephadex G 25**, utilizando para lavar la columna, solución salina con pH 8.0; esto con el fin de remover la fluoresceína no conjugada⁷². Para preservar el conjugado se adicionó timerosal a una concentración final de 1:10.000, el

* American Optical Company. Kleene, N.H., U.S.A.

** Sephadex G 25 Pharmacia Fine Chemicals Inc. New Market, N. J.

conjugado fue repartido en viales en cantidad de 1.0 ml en cada uno y almacenado a -20 C.

Comprobación de la especificidad del conjugado. Para comprobar su especificidad se utilizaron cepas distintas a V. fetus aisladas comúnmente de lavados prepuciales tales como Staphylococcus sp., Pseudomonas sp., Escherichia coli, y Proteus sp.; además se usó un suero normal de conejo y un antisuero no marcado.

Coloración de lavados prepuciales, muestras de semen y secreciones vaginales para fluorescencia. Para determinar la eficacia de la técnica de anticuerpos fluorescentes en la identificación de V. fetus var venerealis se examinaron un total de 72 muestras repartidas así: 58 lavados prepuciales, 10 muestras de semen, 4 secreciones vaginales y un raspado de pene de bovinos de diferentes razas y edades procedentes tanto de la Sabana de Bogotá como fuera de ella.

Procesamiento de las muestras. Los lavados prepuciales fueron centrifugados a 3.500 rpm (7.146 x g) por 30 minutos; descartando el líquido sobrenadante y a partir del sedimento se hicieron los respectivos frotis. Las muestras de semen y las secreciones vaginales se colorearon directamente sin hacerles ningún proceso.

Coloración de las muestras. Los portaobjetos se demarcaron con áreas circulares y en cada área se colocó la respectiva muestra a probar estas se dejaron secar al ambiente y luego se fijaron con etanol por 30

minutos a -20 C; una vez secas se les agregó el conjugado en cantidad de 0.05 ml, se incubaron en una cámara húmeda a 37 C por 30 minutos, luego se lavaron por tres veces con solución salina fosfatada de pH 7.4 (20 minutos cada lavada) y una última lavada, también por 20 minutos, con agua desmineralizada con el fin de remover los iones fosfato; las láminas se dejaron secar y una gota de líquido de montaje para fluorescencia se colocó en cada portaobjeto, se cubrieron con un cubreobjetos y se observaron al microscopio de fluorescencia, marca Carl Zeiss equipado con lámpara de mercurio Osram HBO, 200 W, condensador de campo oscuro, filtro protector de color, filtro excitador UG-1 en combinación filtro barrera 41. Los objetivos utilizados fueron 10 X y 40 X secos, 100 X inmersión con diafragma y oculares 12 y 5 X.

A este se adaptó cámara fotográfica y se utilizó película Kodak, tri-X de 400 asa haciendo exposición 120 y 180 segundos.

RESULTADOS

Las características de las cepas usadas como referencia se presentan en la Tabla 1, en la cual se observa que todas fueron catalasa positivas y no produjeron H₂S.

Los resultados del estudio de cinco medios de cultivo utilizando una cepa estandar de V. fetus se muestran en la Tabla 2, en la cual se observa que todos los cinco medios usados mostraron un buen crecimiento del Vibrio. Se encontraron colonias contables a partir de la dilución 10⁻³, todos mostraron crecimiento en la dilución 10⁻⁵ a excepción del agar Brucella el cual fue negativo a esta dilución; los mejores resultados fueron obtenidos en los medios agar infuso de corazón y cerebro, Florent y Florent modificado, en los cuales se obtuvo un recuento superior a 250 colonias en la dilución 10⁻³, no así en los medios agar cistina corazón y agar Brucella.

En cuanto el estudio de los mismos medios utilizando un lavado prepucial positivo a V. fetus tal como está consignado en la Tabla 3, se encontró que todos son buenos medios para el aislamiento inicial del V. fetus, pero no todos mostraron una igual inhibición de los contaminantes que se encuentran normalmente en la cavidad prepucial.

Los mejores recuentos fueron obtenidos en los medios agar infuso de corazón y cerebro y en el medio de Florent donde en la dilución 10⁻² se obtuvo un recuento de 115 y 108 colonias respectivamente, mientras

que en el agar Brucella el recuento a esta dilución fue de 72 colonias.

Al utilizar un cultivo estandar de V. fetus no se encontró diferencia muy marcada en cuanto al crecimiento del Vibrio en diferentes medios; en cuanto a Proteus y Pseudomonas sp se encontró que estos pueden ser controlados pero no eliminados.

En lo referente al resultado de los dos medios de transporte se encontró que en el medio modificado el V. fetus sobrevive conservando la muestra a -20 C por un máximo de 96 horas y un mínimo de 48 horas. Al conservar la muestra a una temperatura aproximada de 4 C, el organismo alcanzó a sobrevivir, en la mayoría de los casos, un tiempo comprendido entre 24 y 96 horas, lográndose algunas veces obtener vibrios viables a las 120 y 144 horas (seis y siete días respectivamente), pero la viabilidad fue más o menos estandar a las 96 horas en la mayoría de los casos.

A temperaturas comprendidas entre 19 y 20 C aproximadamente, su viabilidad fluctuó entre 24 y 96 horas y en algunos casos se obtuvieron vibrios viables hasta las 120 horas. La viabilidad del Vibrio a esta temperatura, en la mayoría de los casos fue más marcada a las 96 horas. Todos los datos anteriores estan consignados en la Tabla 4.

En cuanto al medio de tioglicolato como medio de transporte se encontró que al conservar las muestras a -20 C el Vibrio alcanzó a sobrevivir hasta 72 horas y conservándolas a una temperatura aproximada de 4 C su viabilidad estuvo comprendida entre 24 y 96 horas. Datos simila-

res fueron obtenidos al conservar las muestras entre 19 y 20 C, Tabla 5.

Al utilizar los dos medios de transporte la baja viabilidad del Vibrio que en ocasiones fue de 24 horas, estuvo relacionada con un alto grado de contaminación que se observó a medida que las muestras se fueron procesando.

De las 100 muestras de campo colectadas con el objeto de probar la eficacia de los medios de transporte, 91 fueron tomadas utilizando el medio de transporte modificado como se observa en la Tabla 6. Usando este medio se encontraron 21 casos positivos a Vibrio fetus var venerealis.

Su identificación fue hecha con base en la morfología de la colonia las cuales fueron típicamente redondeadas, translúcidas y de superficie lisa, Figura 3. La morfología celular fue estudiada utilizando la coloración de Gram observándose cuerpos bacilares en forma de ~~ese~~, en coma y algunas veces en espiral, Gram negativo, tal como lo indica la figura 4.

La actividad de la catalasa fue determinada por el desplazamiento del líquido por el gas y estas mostraron un desplazamiento superior a 5 mm. Ninguna de las cepas produjo ácido sulfhídrico, ni crecieron aeróbicamente ni en medio conteniendo glicina al 1% ni cloruro de sodio al 3.5%.

De las nueve muestras de campo tomadas utilizando como medio de transporte el medio tioglicolato no se obtuvo ningún caso positivo a V. fetus, como se observa en la Tabla 7.

Después de examinar un total de 141 muestras se sacó un promedio permitiendo observar el número de horas en las cuales el Vibrio permaneció viable en los dos medios usados para el transporte de muestras, conservándolas a diferentes temperaturas procesándolas con intervalo de 24 horas después de la toma y sembrando tanto del sobrenadante como del sedimento.

En lo referente al medio modificado los resultados están consignados en la Tabla 8 observándose que al conservar la muestra a -20 C el número aproximado de colonias estuvo entre 25 y 50 colonias, mientras que conservándolas a 4 y 19 C el número aproximado de colonias fluctuó entre 75 y 100, esto se encontró 24 horas después de haber sido tomada la muestra.

A las 48 y 72 horas se obtuvieron datos parecidos a los obtenidos a las 24 horas, no así a las 96 horas donde ya el número de vibrios viables empezó a descender y solo se lograron obtener aproximadamente unas 50 colonias y en casos excepcionales más o menos 25 colonias a las 144 horas.

Como se observa en la Tabla 9, se encontró que la viabilidad que el medio tioglicolato proporcionó al V. fetus fue inferior a la obtenida en

el medio modificado, ya que en el medio tioglicolato el número de vibrios viables 48 horas después de la toma de la muestra fue de 50 colonias aproximadamente al conservar la muestra a -20 C y a 4 C; mientras que a temperatura de 19 C fue de más o menos 25 colonias y a las 96 horas no se obtuvo ninguna colonia dejando la muestra a 19 C.

Anticuerpos Fluorescentes

Suero hiperinmune. Todos los sueros fueron negativos para aglutininas contra V. fetus antes de su inmunización. Para determinar el título de anticuerpos en los sueros, se hicieron diluciones de factor 5 y cuando se obtuvo una aglutinación en la dilución 1:3125, se usó este suero para ser conjugado.

Especificidad del conjugado. Al colorear las cepas controles de V. fetus identificadas con los números 079, 138 y 145 mostraron una alta fluorescencia (++++). Estas tomaron un color verde manzana y la periferia de los organismos se coloreó más intensamente que el centro.

Al tratar cepas de V. fetus con antisuero de conejo no marcado antes de colorearlas con el antisuero de conejo marcado (prueba de inhibición) no se observó fluorescencia mientras que los frotis tratados con suero normal de conejo antes de ser coloreados con el antisuero marcado mostraron muy buena fluorescencia (++++).

Las cepas de Protens sp, Pseudomonas sp y E. coli no colorearon al usar el antisuero marcado, por el contrario cepas de Staphylococcus al

ser tratadas con este antisuero mostraron fluorescencia con bastante intensidad (+++).

Coloración de las muestras. En frotis de lavados prepuciales muestras de semen, raspado de pene y secreciones vaginales, el V. fetus mostró muy buena fluorescencia con una intensidad bastante marcada notándose las formas en coma, ese y en espiral, Figura 5.

Se examinaron por ambos procedimientos 74 muestras, encontrándose 44 negativas, de las 29 restantes positivas 18 lo fueron por ambos procedimientos (inmunofluorescencia y cultivo) y 11 por inmunofluorescencia solamente.

No se obtuvieron resultados positivos por cultivo y negativos por inmunofluorescencia. No se contó el número de microorganismos presentes en cada muestra, pero si se observó mayor cantidad en unas que en otras. Todos los datos anteriores están consignados en la Tabla 10.

DISCUSION

De los cinco medios de cultivo estudiados para el aislamiento del Vibrio fetus a partir de muestras tales como lavados prepuciales, secreciones vaginales y semen, dos fueron más efectivos a saber: los medios agar infuso de corazón y cerebro y el medio Florent. Estos fueron los que mostraron un mayor crecimiento del organismo en cuestión y una mayor inhibición de los contaminantes que comunmente se encuentran en la cavidad prepucial.

Se confirmaron los resultados que Shepler et al⁹⁹ obtuvieron con los medios agar infuso de corazón y cerebro con la diferencia de que en su trabajo ellos le adicionaron antibióticos.

Al comparar el medio Florent modificado con los demás se encontró que actua casi en igual forma que el medio de Florent; en este medio se observó un fácil y rápido desarrollo de varios contaminantes, esto es debido posiblemente a que el medio Florent modificado tiene como componente principal el tioglicolato, medio excelente para el aislamiento de cualquier tipo de microorganismo bien sea bajo condiciones aeróbicas, semiaeróbicas o anaeróbicas.

Los resultados obtenidos con los medios Florent y Florent modificado confirman lo concluido por Keshava et al⁴⁵.

Resultados similares o los reportados por Hansen³⁵ fueron obtenidos al utilizar el medio de tioglicolato para el mantenimiento de cepas en el laboratorio, este medio proporciona una viabilidad al V. fetus superior a la observada al utilizar el medio de thiol con el mismo objeto.

Con el medio agar cistina corazón los resultados no fueron muy satisfactorios en lo referente a aislamiento inicial e inhibición de contaminantes. Estos hallazgos contradicen en parte los resultados que Munday y Kramer³⁶ obtuvieron, sin embargo, esto no indica que el medio deba descartarse cuando se trate de aislar V. fetus.

Procesando los lavados prepuciales y sembrando tanto del sobrenadante como del sedimento se obtuvo una proporción de aislamiento más o menos similar, notándose que al sembrar el sedimento se encontró un mayor número de vibrios que cuando se sembró del sobrenadante; con la ventaja de que con el sobrenadante se obtuvo un menor número de contaminantes.

En lo referente a los dos medios de transporte, los mejores resultados se obtuvieron con el medio modificado de Mundt, en el cual la viabilidad de Vibrio es mucho más marcada que en el medio de tioglicolato, en el primero se obtuvieron vibrios viables hasta las 144 horas no ocurriendo esto con el tioglicolato.

Pudo observarse que las muestras dejadas a temperatura ambiente y tomadas en el medio de tioglicolato tienden a contaminarse mucho más rápidamente que las tomadas en el medio modificado, contaminación que em-

pezó a observarse 48 horas después de la toma y debido a esta alta contaminación se dificultó el aislamiento del Vibrio en una forma completamente pura:

Al conservar las muestras a temperatura de refrigeración se observó una baja en el número de contaminantes acompañada también de una baja del Vibrio pero se obtuvieron cultivos mucho más puros predominando esto en las muestras que habían sido tomadas en el medio modificado.

A temperatura de congelación el número de contaminantes fue mínimo y el número de vibrios fue inferior que conservando la muestra en refrigeración.

Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Mundt quien encontró Vibrios viables hasta las 112 horas al conservar la muestra en refrigeración y hasta cuatro días a temperatura del laboratorio, de acuerdo con el autor este medio fue efectivo tanto para Vibrio como para Trichomonas. Se considera que la modificación hecha al medio de Mundt dió buenos resultados.

Al realizar este trabajo se encontraron resultados muy similares a algunos reportados^{16,37,89} quienes afirman que un solo resultado negativo a Vibrio no indica que el animal no sea un portador, pues aunque el toro este infectado no siempre hay igual posibilidad de aislamiento del Vibrio.

El raspado de pene, siguiendo la técnica descrita por Gibson et al³³ fue el procedimiento que dió mayor proporción de aislamientos del Vibrio, obteniéndose mayor número de microorganismos. Este método es superior a los lavados prepuciales pues se obtiene parte de la mucosa y se llega hasta las criptas epiteliales, sitio donde el Vibrio se encuentra más concentrado. Esto comprueba los resultados del autor. Aunque en este trabajo no se hizo un estudio muy detallado en cuanto a la viabilidad de las Trichomonas en el medio modificado se obtuvieron mejores resultados a los obtenidos por Mundt⁶⁶ pues se logra la rápida multiplicación y la viabilidad de las Trichomonas hasta por ocho días conservando las muestras a temperatura ambiente.

La técnica de anticuerpos fluorescentes fue aplicada con éxito para la identificación del V. fetus de lavados prepuciales, secreciones vaginales, raspado de pene y semen y a la vez como comparación con las técnicas de cultivo.

Aunque en este trabajo no se probó la especificidad del conjugado con cepas de V. fetus var intestinalis algunos investigadores⁹⁹ han encontrado reacciones cruzadas entre V. fetus var venerealis.

Las formas cocoides de Staphylococcus encontradas al colorear las muestras con el conjugado no fueron causa de interferencia en la interpretación, pues estas formas pueden ser fácilmente diferenciadas de las formas de V. fetus. Otras bacterias encontradas en la cavidad prepucial tampoco fueron causa de interferencia pues no colorearon con el conjuga-

do para V. fetus, tampoco lo fueron los espermatozoides que fluorescieron con una intensidad bastante marcada.

Los resultados de este estudio indicaron que la técnica de anticuerpos fluorescentes o la técnica de cultivo son satisfactorias como técnicas de rutina para detectar toros portadores aunque los no portadores no pueden ser demostrados con ninguna de las dos técnicas en base a un solo resultado negativo.

La ventaja más grande de esta prueba es la de que puede hacerse de material altamente contaminado y además no es necesario que se encuentren vibrios viables.

La técnica de cultivo es adecuada para detectar V. fetus en la mayoría de los toros portadores. En los casos positivos a inmunofluorescencia y negativos al cultivo se puede pensar que el no aislamiento de Vibrio pudo ser debido al hecho de que los animales hubieran recibido un tratamiento y solo se encontraban pocos vibrios viables o todos muertos o también el material altamente contaminado el cual no permitió hacer su aislamiento como en casos en que la muestra contiene orina.

Al comparar las diferentes muestras procesadas se encontró que las muestras que habían sido tomadas en el medio de transporte modificado dieron resultados positivos por cultivo e inmunofluorescencia, por el contrario las muestras tomadas en solución salina casi todas fueron negativas por cultivo y positivas por inmunofluorescencia lo que indica

que la técnica de anticuerpos fluorescentes es más sensible que la técnica de cultivo.

RESUMEN

La eficacia de cinco medios de cultivo para el aislamiento inicial del Vibrio fetus y de dos medios para el transporte de muestras de campo al laboratorio fue estudiada.

Los medios que mostraron una adecuada multiplicación del V. fetus y a la vez permitieron una marcada inhibición de contaminantes fueron los medios agar infuso de corazón y cerebro y el medio Florent.

La viabilidad que el medio de transporte modificado proporcionó al V. fetus en cualquier tipo de muestra de origen bovino fue de aproximadamente 96 a 120 horas cuando la muestra se deja a temperatura ambiente; o de 96 horas dejándola en refrigeración.

En el tioglicolato como medio de transporte puede dejarse la muestra a temperatura ambiente hasta por 76 horas; se comprobó que la eficacia de este medio está relacionada con la asepsia que se tenga durante la toma de la muestra.

El V. fetus fue identificado en muestras de lavados prepuciales, semen, raspado de pene y secreciones vaginales al usar conjuntamente la técnica de cultivo e inmunofluorescencia.

Antisueros de V. fetus preparados en conejos y marcados con isotiocianato de fluoresceína fueron usados para colorear frotis preparados de cepas de V. fetus. Coloraciones no específicas ocurrieron con esperma-

tozoides y algunas veces con detritos celulares, pero no fueron causa de interferencia para la interpretación de los resultados.

Reacciones cruzadas no se observaron con otras tres especies de bacterias probadas, pero si ocurrieron con Staphylococcus sp diferenciando fácilmente estas por su morfología.

El conjugado fue usado para colorear 72 muestras de toros y novillas, los cuales incluyeron toros conocidos portadores y toros de diferente raza y edad a los cuales nunca se les había aislado V. fetus.

Los resultados de estos ensayos indicaron que la técnica de anticuerpos fluorescentes puede ser utilizada para detectar toros portadores. Sin embargo, un sólo resultado negativo utilizando las dos técnicas no indica que el animal esté libre de la enfermedad.

A P E N D I C E

TABLA 1. Características de tres cepas de Vibrio fetus usadas como referencia para el estudio de medios de cultivo y transporte.

Identif.	Origen	Prueba Catalasa	Produc. H ₂ S	Tolerancia Glicina al 1%	Tolerancia Cloruro de Sodio al 3.5%	Crecimiento aeróbico
079	Feto bovino	+	-	-	-	-
138	Lavado prepucial	+	-	-	-	-
145	Feto bovino	+	-	-	-	-

TABLA 2. Estudio de cinco medios de cultivo a partir de un cultivo estandar de Vibrio fetus.

Diluciones	Agar Infuso de Corazón y Cerebro		Agar Cistina Corazón		Medio Florent		Medio Florent Modificado		Agar Brucella	
	Rec.*	Prom.**	Rec. Prom. D.***	Rec. Prom. D.	Rec. Prom. D.	Rec. Prom. D.	Rec. Prom. D.	Rec. Prom. D.	Rec. Prom. D.	Rec. Prom. D.
10 ⁻³	296			120	280		285	200		
	290	5		100	281	280	285	206	204	6
	302			105	280		279	208		
10 ⁻⁴	30	3		8	31		30	15		
	27			12	30	30	35	16	15	0
10 ⁻⁵	0	1		0	2		2	0		
	5	3		0	1	1	1	0	0	0
	5			0	1	1	1	0	0	0

* Recuento

** Promedio

*** Desviación estandar

TABLA 3. Estudio de cinco medios de cultivo a partir de un lavado prepupal positivo a Vibrio fetus.

Diluciones	Agar Infuso de Corazón y Cerebro		Agar Cistina Corazón		Medio Florent		Medio Florent Modificado		Agar Brucella	
	Rec.*	Prom.**	Rec.	Prom. D.***	Rec.	Prom. D.	Rec.	Prom. D.	Rec.	Prom. D.
10 ⁻²	120		95		112		80		76	
	115	4	90	1	108	3	76	1	70	3
	110		91		106		75		71	
10 ⁻³	15		10		8		5		6	
	10	2	8	0	12	2	4	0	5	0
	12		9		9		4		5	
10 ⁻⁴	1		1		0		0		0	
	2	0	0	1	1	0	0	0	0	0
	1		0		0		0		0	

* Recuento

** Promedio

*** Desviación estandar

TABLA 4. Viabilidad del Vibrio fetus en muestras tomadas del bovino infectado experimentalmente. Medio Modificado.

Identif. de Muestra	Clase de Muestra	Resultados	Temperaturas Aprox.		
			-20C	4C	19C
			Viabilidad en horas		
2	Raspado de pene	+	48	72	72
3	2 lavados prepuciales	+	72	96	96
5	1 lavado prepucial	+		96	96
8	1 lavado prepucial	-			
10	1 lavado prepucial	+		120	120
11	1 lavado prepucial	+		96	96
13	1 lavado prepucial	-			
15	1 lavado prepucial	+		120	120
17	1 lavado prepucial	+		96	96
18	1 lavado prepucial	+	96	96	72
20	1 lavado prepucial	+	72	96	96
22	1 lavado prepucial	-			
23	1 lavado prepucial	+	72	96	96
25	1 lavado prepucial y semen	+		72	48
26	1 lavado prepucial	+		72	48
28	1 lavado prepucial	+		120	96
29	1 lavado prepucial	+		72	72
31	1 labado prepucial	-			

(continúa)

Continuación Tabla 4.

Identif. de Muestra	Clase de Muestra	Resultados	Temperaturas Aprox.	
			-20C Viabilidad en horas	4C 19C
32	1 lavado prepucial	+	144	96
33	1 lavado prepucial	+	24	24
34	1 semen	+	24	24
35	1 lavado prepucial	+	120	48
38	1 lavado prepucial y raspado de pene	+	144	120
39	1 lavado prepucial	+	96	96
40	1 semen	+	96	96
41	1 raspado de pene	+	96	96

TABLA 5. Viabilidad del Vibrio fetus en muestras tomadas del bovino infectado experimentalmente. Medio tioglicolato.

Identif. de Muestra	Clase de Muestra	Resultados	Temperaturas Aprox.		
			-20C	4C	19C
			Viabilidad en horas		
1	1 lavado prepucial	+	72	96	96
4	1 lavado prepucial	+	72	72	72
6	1 lavado prepucial	-			
7	1 lavado prepucial	-			
9	1 raspado de pene	-			
12	1 raspado de pene	+		24	24
14	1 lavado prepucial	-			
16	1 lavado prepucial	-			
19	1 lavado prepucial	+		48	48
21	1 lavado prepucial	-			
24	1 lavado prepucial	+		96	96
27	1 lavado prepucial	+		72	72
30	1 lavado prepucial	-			
36	1 lavado prepucial	-			
37	1 lavado prepucial	-			

TABLA 6. Muestras de campo utilizando el medio modificado para el transporte de las muestras.

Identif. de Muestra	Clase de Muestra	Procedencia	Rana	Edad	Resultados
1	1 lavado prepucial	Ubaté	Holst.	3a.*	+
2	1 lavado prepucial	Ubaté	Holst.	3a.	+
3	1 moco vaginal	Ubaté	Holst.	2½a.	-
5	1 moco vaginal	Ubaté	Holst.	Ad.**	+
6	1 moco vaginal	Ubaté	Holst.	Ad.	-
7	1 moco vaginal	Ubaté	Holst.	Ad.	+
8	1 moco vaginal	Ubaté	Holst.	Ad.	-
9	1 moco vaginal	Ubaté	Holst.	Ad.	+
10	2 lavado prepucial	Facatativá	Normando	4-6a.	-
11	4 moco vaginal	Bosa			-
12	2 lavado prepucial	Soácha	Holst.	2a.	-
13	1 lavado prepucial	Ubaté	Holst.	3a.	-
14	1 lavado prepucial	Chocontá	Holst.	3a.	+
15	1 lavado prepucial	Subachoque	Holst.	3a.	-
16	6 lavado prepucial	Zipaquirá	Holst.	Ad.	-
17	1 moco vaginal	Zipaquirá	Holst.	Ad.	-

* Años

** Adulto

(continúa)

Continuación Tabla 6.

Identif. de Muestra	Clase de Muestra	Procedencia	Raza	Edad	Resultados
18	1 lavado prepucial	Sogamoso	Holst.	Ad.	-
20	1 lavado prepucial	Soacha	Holst.	3a.	-
21	3 moco vaginal	Soacha	Holst.	Ad.	-
22	1 lavado prepucial	Albán	Holst.	3½a.	-
23	1 lavado prepucial	Granada	Holst.	Ad.	-
24	3 lavado prepucial	Madrid	Holst.	4a.	-
25	1 lavado prepucial	Madrid	Holst.	Ad.	-
26	6 lavado prepucial	Mosquera	varias	Ad.	+
26	6 semen	Mosquera	varias	Ad.	+
27	1 lavado prepucial	Fusagasugá	P. Suizo	Ad.	-
30	1 semen	Fusagasugá	Cebú	Ad.	-
31	1 semen	Fusagasugá	Cebú	Ad.	-
32	1 lavado prepucial	Bosa	Holst.	3a.	-
34	1 lavado prepucial	Gachancipá	Normando	Ad.	-
35	1 lavado prepucial	Facatativá	Holst.	2½a.	-
36	1 lavado prepucial		Holst.	Ad.	-
37	3 lavado prepucial	Honda	Cebú	Ad.	-
38	1 lavado prepucial	Chocontá	Holst.	3a.	-

(continúa)

Continuación Tabla 6.

Identif. de Muestra	Clase de Muestra	Procedencia	Raza	Edad	Resultados
39	1 lavado prepucial	Subachoque	Holst.	3a.	-
40	1 lavado prepucial	Bosa			-
42	1 lavado prepucial	Tenjo	Holst.	Ad.	+
43	1 lavado prepucial	Mosquera	Red Poll	Ad.	-
44	6 lavado prepucial	Nemocón	Holst. y Normando	Ad.	+
46	2 lavado prepucial	Mosquera	Red Poll	Ad.	-
47	4 lavado prepucial	Honda	Cebú	Ad.	-
48	5 lavado prepucial	Mosquera	A. angus	Ad.	-
49	1 lavado prepucial	Nemocón	Holst.	Ad.	-
50	2 lavado prepucial	Funsa y Madrid	Holst.	2-3a.	-
51	1 lavado prepucial	Madrid	Holst.	Ad.	-
52	4 lavado prepucial	Subachoque	Normando	Ad.	+
53	1 lavado prepucial	Chocontá	Holst.	5a.	-
54	1 lavado prepucial	Madrid	Holst.	Ad.	-

Las muestras identificadas con el número 26 fueron todas positivas a

V. fetus var venerealis.

TABLA 7. Muestras de campo utilizando el medio tioglicolato para el transporte de las muestras.

Identif. de Muestra	Clase de Muestra	Procedencia	Raza	Edad	Resultados
4	1 moco vaginal	Ubaté	Holst.	2a.*	-
19	2 lavado prepucial	Gota	Holst.	2½a.	-
28	1 lavado prepucial	Chía	Holst.	3a.	-
29	1 lavado prepucial	Zipaquirá	Holst.	Ad.**	-
33	2 lavado prepucial	Facatativá	Holst.	Ad.	-
41	1 lavado prepucial		Holst.	Ad.	-
45	1 lavado prepucial	Mosquera	Red Poll	Ad.	-

* Años

** Adulto

TABLA 8. Promedio de viabilidad del Vibrio fetus en el medio modificado.

Horas	Temperaturas Aproximadas					
	-20C		4C		19C	
	Sobre- nadante	Sedi- mento	Sobre- nadante	Sedi- mento	Sobre- nadante	Sedi- mento
24	+	++	+++	++++	+++	+++
48	+	+	++	+++	++	+++
72	+	+	+	+++	+	+++
96	-	+	+	++	+	++
120	-	-	+	+	-	-
144	-	-	-	+	-	+

+++++ 100 colonias aproximadamente
 +++ 75 colonias aproximadamente
 ++ 50 colonias aproximadamente
 + 25 colonias aproximadamente
 - Crecimiento negativo

TABLA 9. Promedio de viabilidad del Vibrio fetus en el medio de tioglicolato.

Horas	Temperaturas Aproximadas					
	-20C		4C		19C	
	Sobre- nadante	Sedi- mento	Sobre- nadante	Sedi- mento	Sobre- nadante	Sedi- mento
24	+	+++	++	+++	++	++++
48	+	++	+	++	+	-
72	-	+	+	+	+	-
96	-	-	-	+	-	-
120	-	-	-	+	-	-
144	-	-	-	-	-	-

++++ 100 colonias aproximadamente
 +++ 75 colonias aproximadamente
 ++ 50 colonias aproximadamente
 + 25 colonias aproximadamente
 - Crecimiento negativo

TABLA 10. Inmunofluorescencia y cultivo del Vibrio fetus en lavados prepuciales, semen, raspado de pene y secreciones vaginales.

Clase de Muestra	Cultivo	Inmunofluorescencia
40 lavados prepuciales	-	-
10 lavados prepuciales	+	+
7 muestras de semen	+	+
3 muestras de semen	-	-
2 secreciones vaginales	-	+
1 raspado de pene	+	+
8 lavados prepuciales	-	+
2 mocos cervicales	-	+



Fig. 1. Técnica y equipo utilizado en la toma de lavados prepuciales.



Fig. 2. Presión que debe hacerse en la uretra en el momento de toma de la muestra.

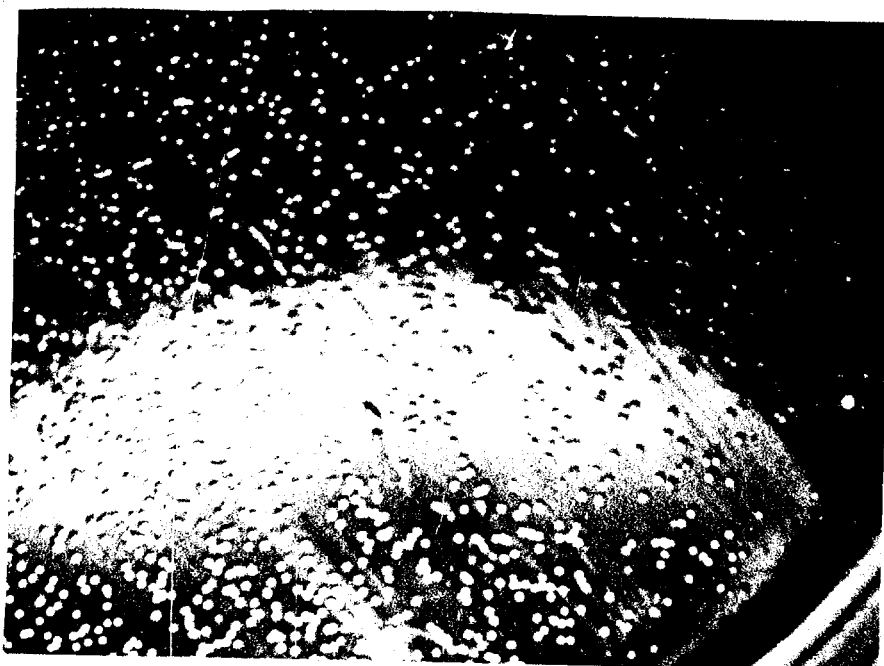


Fig. 3. Colonias de Vibrio fetus en agar sangre.

2X



Fig. 4. Morfología del Vibrio fetus de un cultivo de
semen en agar sangre. Coloración de Gram.
2.000X

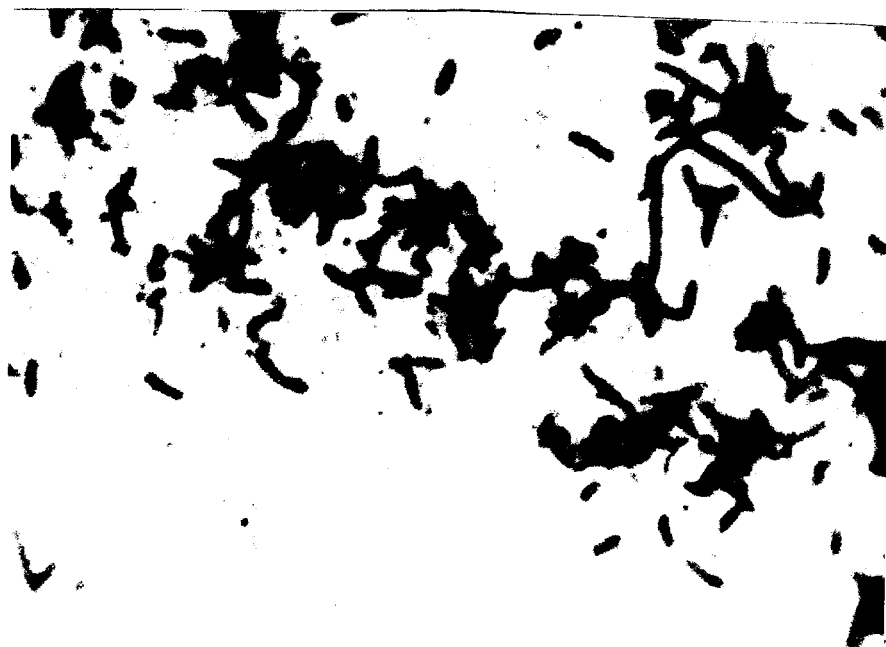


Fig. 5. Frotis de una cepa de Vibrio fetus conservada en medio tioglicolato, coloreada por la técnica de anticuerpos fluorescentes. Negativo. 3.300X

BIBLIOGRAFIA

1. ADLER, B.E.; N.O. ALBERTSEN; L. RABECH and L. ZSABO. 1952.
Diagnosis of Vibrio fetus infection in bulls by experimental transmission. Nord. Vet. Med. 4:462-470.
2. ALFIMOVA, H.V. 1966. Cultivation of Vibrio fetus on chick embryos.
Biol. Abst. 47:23, 113358.
3. _____. 1967. Results of study of the morphological cultural,
and biochemical properties of strains of Vibrio fetus. Biol.
Abst. 48:17.
4. AYCARDI, E. 1962. La seroaglutinación en la vibriosis genital
bovina. Tesis. Universidad Nacional de Colombia.
5. BARGER, E.A. 1928. Report of a case of abortion induced by Vibrio
fetus. Jour. Amer. Vet. Med. Assn. 72:468-474.
6. BARTLETT, D.E. 1949. Procedures for diagnosis bovine venereal
trichomoniasis and handling affected herds. Jour. Amer. Vet.
Med. Assn. 114:293.
7. BASDEN, E.H.; M.E. TOURTELLOTE; W.N. PLASTRIDGE, and J.S. TUCKER.
1968. Genetic relationship among bacteria classified as vibrios.
Jour. Bacteriol. 95:439-443.

8. BELDEN, E.L. and G.W. ROBERSTAD. 1965. Application of fluorescent antibody for serotyping Vibrio fetus. Amer. Jour. Vet. Rese. 26:1437-1447.
9. BERG, R.L.; J.W. JUTILA and B.D. FIREHAMMER. 1971. A revised classification of Vibrio fetus. Amer. Jour. Vet. Res. 32(1):11-22.
10. BIBERSTEIN, E.L. 1956. Growth phase and bacterial morphology as related to antigenic sensibility of Vibrio fetus culture. Cornell Vet. 46:171-177.
11. BIER, O. 1966. Bacteriologia e imunologia. 13ed. Sao Paulo. Edicoes Melhoramentos. 991 p.
12. BOKKENHEUSER, V. 1970. Vibrio fetus infection in man. I. Ten new cases and some epidemiologic observations. Amer. Jour. Epidemiol. 91:404-409.
13. BLOM, E. and N.O. CHRISTENSEN. 1947. Studies on the pathological condition in the testis, epididimis and accessory sex glands in the bull. Skand. Vet. Tidskr. 37:1-49.
14. BOND, J.M. 1957. Characteristics of colonial forms of Vibrio fetus. Amer. Jour. Vet. Rese. 18:449-455.
15. BREED, R.A.; E.C. MURRAY and N.R. SMITH. 1957. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 7ed. Baltimore. The Williams and Wilkins Co.

16. BRYNER, J.H. and A.H. FRANK. 1955. Laboratory techniques for the isolation and propagation of Vibrio from cattle. Amer. Jour. Vet. Rese. 16:634-635.
17. _____ A.H. FRANK. 1955. A preliminary report on the identification of Vibrio fetus. Amer. Jour. Vet. Rese. 16:76-78.
18. _____ A.H. FRANK and P.A. O'BERRY. 1962. Dissociation studies of Vibrio from bovine genital tract. Amer. Jour. Vet. Rese. 23:32-41.
19. CHANG, W. and J.E. OGG. 1970. Transduction in Vibrio fetus. Amer. Jour. Vet. Rese. 31:919-924.
20. _____ J.E. OGG. 1971. Transduction and mutation to glycine tolerance in Vibrio fetus. Amer. Jour. Vet. Rese. 32:649-653.
21. CLARK, B.L.; I.D.V. NEWSAN; MARY J. MONSBOURGH and J.H. DUFTY. 1967. Experimental Vibrio fetus infection in cows. Studies of immunizing properties of living organisms injected subcutaneously. Aust. Vet. Jour. 43(9):341-345.
22. _____ J.H. DUFTY and MARY J. MONSBOURGH. 1969. Observations on the isolation of Vibrio fetus (venerealis) from the vaginal mucus of experimentally infected heifers. Aust. Vet. Jour. 45:209-211.

23. DOZSA, L. 1965. The effect of Vibrio bubulus on the bovine endometriun. Jour. Amer. Vet. Med. Assn. 147:620-625.
24. DUFTY, J.H. 1967. Diagnosis of vibriosis in the bull. Austral. Vet. Jour. 43(10):433-437.
25. DUNN, H.O.; K. BURDA; W.C. WAGNER and H.L. GILMAN. 1965. Isolation of Vibrio fetus from bovine semen. Cornell Vet. 55(2): 220-229.
26. FIREHAMMER, B.D. and R.L. BERG. 1965. The use of temperature tolerance in the identification of Vibrio fetus. Amer. Jour. Vet. Rese. 26:995-997.
27. _____ R.L. BERG. 1966. Bacterins for immunization against bovine vibriosis. Jour. Amer. Vet. Med. Assn. 149:1640-1642.
28. _____ M. BORDER. 1968. Isolation of temperate bacteriophages from Vibrio fetus. Amer. Jour. Vet. Rese. 29(2):229-235.
29. FLETCHER, R.D. 1963. Chemically defined medium for some micro-aerophilic vibrios. Jour. Bacteriol. 85(5):992-995.
30. FRANK, A.H. and J.H. BRYNER. 1952. An instrument for collecting samples from the reproductive tracts of cows for the bacteriological study. Jour. Amer. Vet. Med. Assn. 121:97-98.

31. _____ J.H. BRYNER and B.S. CARUTHERS. 1958. A comparison of the effect of catalase positive and catalase negative Vibrio on the fertility of cattle. Amer. Jour. Vet. Rese. 19:108-111.
32. FUNG, P.H. and J.A. WINTER. 1968. Effects of penicillin and cell wall glucopeptides of the two varieties of Vibrio fetus. Jour. Bacteriol. 96(6):1889-1894.
33. GIBSON, C.D.; W.H. DREHER and R. ZEMJANIS. 1970. Simplified technique for collection of preputial samples from bulls for isolation of Vibrio fetus. Jour. Amer. Vet. Med. Assn. 157(6):
34. GOLDSTEIN, G.; IRENE S. SLIZIS and MERRIL W. CHASE. 1961. Studies of fluorescent antibody staining. I. Non specific fluorescence-coupled sheep anti rabbit globulins. Jour. Exp. Med. 14:89-110.
35. HANSEN, P.A.; K.E. PRICE and M.F. CLEMENTS. 1952. Suitable thioglycollate media for the cultivation of Vibrio fetus. Jour. Bacteriol. 64:772.
36. HOERLEIN, A.B. and T. KRAMER. 1963. Cervical mucus for the diagnosis of vibriosis in cattle. Jour. Amer. Vet. Med. Assn. 143:868-872.

37. _____ T. KRAMER; E.J. CARROLL; W.W. BROWN; J.H. SCOTT and
L. BALL. 1964. Vibriosis in range cattle. Jour. Amer. Vet.
Med. Assn. 144(2):142-151.
38. _____ E.J. CARROLL; T. KRAMER and W.H. BEKKENHOUSER. 1965.
Bovine vibriosis immunization. Jour. Amer. Vet. Med. Assn.
146:828-835.
39. HORTER, R. 1960. Suceptibility to neomycin of Vibrio fetus,
Pseudomonas, E. coli and other bacterias. Resumen del Vet.
Bull. 31(3):661.
40. HUDDLESON, I.F. 1948. A satisfactory medium for the isolation,
cultivation and maintenance of viability of Vibrio fetus.
Jour. Bacteriol. 56:508.
41. HUGHES, D.E. 1956. Notes on vibriosis with special reference to
the isolation of Vibrio fetus from semen and preputial fluids.
Cornell Vet. 46:249-256.
42. JAKOVLJEVIC, M.B. and H.B.R. BEATTIE. 1966. Characteristics of
growth of some Vibrio fetus strains in semisolid nutrient agar.
Aust. Vet. Jour. 42(10):396-401.
43. JANSEN, J. and H. KUNST. 1951. Cultivation of Vibrio fetus.
Nature. 167:564.

44. _____ H. KUNST. 1951. The eggs as a culture medium for Vibrio fetus. Jour. Amer. Vet. Med. Assn. 119:460.
45. KESHAVA, B.; S. MURTHY; O. SODERLIND and I. SETTERGREN. 1968. The serological and bacteriological diagnosis of Vibrio fetus infection in Indian cattle and buffaloes. Indian. Vet. Jour. 45(11):895-902.
46. KEYLOV, Y.A. 1968. An accelerated method for making a serological differentiation of the pathogen of vibriosis in cattle. Biol. Abst. 49(18).
47. KIGGINS, E.M.; W.N. PLASTRIDGE; L.F. WILLIAMS and H.L. EASTERBROOKS. 1955. Cross agglutination between Vibrio fetus and Brucella abortus. Amer. Jour. Vet. Rese. 16:291-294.
48. _____ W.N. PLASTRIDGE. 1956. Effect of gaseous environment on growth and catalase content of Vibrio fetus cultures of bovine origin. Jour. Bacteriol. 72:397-400.
49. KITA, E.; K. OGIMOTO and T. SUTO. 1967. Detection of Vibrio fetus from bulls by means of fluorescent antibody techniques. Biol. Abst. 48(17):86962.
50. KOSHOVHAROBS, L.V. 1969. Fundamental requirements for the isolation of Vibrio from cattle. Vet. Med. Nauki. 6(2):19-24.

51. KUZDAS, C.D. and E.V. MORSE. 1956. Physiological characteristics differentiating Vibrio fetus and other vibrios. Amer. Jour. Vet. Rese. 17:331-336.
52. _____. 1956. Selective medium for the isolation of Vibrio fetus and related vibriosis. Jour. Bacteriol. 71:251-252.
53. LAING, J.A. 1960. Vibrio fetus infection of cattle. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Rome. 1960.
54. LEIN, D.; I. ERICKSON; A.J. WINTER and K. McENTEC. 1968. Diagnosis, treatment and control of vibriosis in an artificial insemination center. Jour. Amer. Vet. Med. Assn. 153:1574-1580.
55. LOESCHE, W.J.; J.R. GIBSON and S.S. SOCRANSKY. 1965. Biochemical characteristics of Vibrio sputorum and relationship to Vibrio bubulus and Vibrio fetus. Jour. Bacteriol. 89(4):1109-1116.
56. MAMEDOV, T.A. 1967. Cultivation and preservation of the Vibrio agent (Vibrio fetus). Biol. Abst. 48(16):81359.
57. McDEVITT, H.O.; J.H. PETERS; L.W. POLLARD; J.G. HARTER and A.H. COONS. 1963. Purification and analysis of fluorescent-labeled antisera by column chromatography. Jour. Immunol. 30:634-642.
58. McENTEC, K. and D.E. HUGHES. 1964. Experimentally produced vibriosis in dairy heifers. Cornell Vet. 44:376-394.

59. McFADYEAN, J. and S. STOKMAN. 1909-1913. Report of the departmental committee appointed by the Board of Agriculture and Fisheries to inquire into epizootic abortion. Appendix to part III. Abortion in sheep. London. 1918.
60. MELLICK, P.W.; A.J. WINTER and K. McENTEC. 1965. Diagnosis of vibriosis in the bull by use of fluorescent antibody, technique. Cornell Vet. 55:280-294.
61. MERCHANT, I.A. and R.A. PACKER. 1967. Veterinary Bacteriology and Virology. 7ed. Ames. Iowa State University Press. 260 p.
62. MOHANTY, S.B.; G.J. PLUMMER and J.E. LABER. 1962. Biochemical and colonial characteristics of some bovine vibriosis. Amer. Jour. Vet. Rese. 23:554-557.
63. MOORE, G.R. 1950. Clinical aspects of Vibrio fetus infection in cattle. Jour. Amer. Vet. Med. Assn. 116:190-192.
64. MORSE, E.V.; M. RISTIC; G.W. ROBERTSTAD and D.W. SCHNEIDER. 1953. Cross agglutination reaction among Brucella, Vibrio and other microorganisms. Amer. Jour. Vet. Rese. 14:324-327.
65. MUNDAY, B.L.; F.B. RYAN; S.J. KING and A. CORBOULD. 1966. Preparturient infections and other causes and foetal loss in sheep and cattle in Tasmania. Aust. Vet. Jour. 42(16): 189-193.

66. MUNDT, W. 1958. Diagnosis of Vibrio fetus and Trichomonas foetus infection in bull by culture from preputial washings using a special medium. Prakt. Tierarzt. 5:140-148. Resu-
men del Vet. Bull. 29(1):363. 1959.
67. MARSHALL, J.D.; W.C. EVELAND and C.H. SMITH. 1958. Superiority of fluorescein-isothiocyanate (Riggs) for fluorescent anti-
body technic with a modification of its application. Proc.
Exp. Biol. Med. 98:898-900.
68. NAGESWARARAC, C. and H. BLOBELL. 1963. Antigenic substance isolated from filtrates of Vibrio fetus broth culture. Amer.
Jour. Vet. Rese. 24(103):1313-1320.
69. O'BERRY, P.A. 1964. Comparison of three methods of serum fractionation in the preparation of Vibrio fetus fluorescent antibody conjugates. Amer. Jour. Vet. Rese. 25:1669-1672.
70. PARK, R.W.A.; I.B. MONRO, D.R. MELTROSE and D.L. STEWART. 1962. Observations on the ability of two biochemical types of Vibrio fetus to proliferate in the genital tract of cattle and their importance with respect to infertility. Brit. Vet.
Jour. 18(10):411-420.
71. PAYNE, J.M. 1960. The bacteriology of experimental infections of the rats placenta. Jour. Path. Bacteriol. 80:205-213.

72. PETERS, H. 1963. Construction and use of a small Sephadex column for the separation of fluorescent antibodies stain. Tech. 38:260.
73. PLASTRIDGE, W.N. 1941. Cultural and serological observations on Vibrio fetus. Jour. Bacteriol. 42:816-817.
74. _____ L.F. WILLIAMS. 1943. Observations of Vibrio fetus infection in cattle. Jour. Amer. Vet. Med. Assn. 102:89-95.
75. _____. 1949. An improved method for the preparation of Vibrio fetus agglutination antigen. Jour. Bacteriol. 57: 657-658.
76. _____ H.L. EASTERBROOKS and L.F. WILLIAM. 1953. The tampon method of collection and the examination of cervico vaginal mucus for Vibrio fetus agglutinins. Jour. Amer. Vet. Med. Assn. 122:516-520.
77. _____ R.C. WALKER; L.F. WILLIAMS; E.F. STULA and E.M. KIGGINS. 1957. Isolation of Vibrio fetus from bulls. Amer. Jour. Vet. Rese. 18:575.
78. _____. 1959. Vibriosis in cattle. Department of Animal Diseases Storrs Agricultural Experiment Station College of Agriculture. University of Connecticut. Storrs, Connecticut.

79. PLUMMER, G.J.; W.C. DUVALL and V.M. SHEPLER. 1962. A preliminary report on a new technic for isolation of Vibrio fetus from carrier bulls. Cornell Vet. 52:110.
80. POLYAKOVA, O.A. 1968. Use of fluorescent antibody technique to detect the pathogen Vibrio in cattle and sheep in culture and pathological materials. Biol. Abst. 49(16).
81. Reich, C.V. 1954. Gaseous requirements of Vibrio fetus. Jour. Bacteriol. 72:397-400.
82. _____ E.V. MORSE and J.B. WILSON. 1956. Gaseous requirements for growth of Vibrio fetus. Amer. Jour. Vet. Rese. 17:140-143.
83. RINGEN, K. and F.W. FRANK. 1963. Differentiation of Vibrio fetus and Vibrio bubulus based upon reaction in media containing ferrous sulfate. Jour. Bacteriol. 86:344-345.
84. RISTIC, M.; E.V. MORSE; L. WIPF and S.M. MENUTT. 1954. Transmission of experimental Vibrio fetus infection among guinea pigs and hamsters. Amer. Jour. Vet. Res. 15:309-313.
85. _____ D.A. SANDERS and M.E. TAYLOR. 1955. Vibrio fetus infection in cattle. I. A comparative study of agglutinins response in cervico vaginal mucus and blood serum to homologous antigens, following abortion. Amer. Jour. Vet. Rese. 16:246-250.

86. _____ C.A. BRANDLY. 1959. Characterization of Vibrio fetus antigens. I. Chemical properties and serological activities of a soluble antigen. Amer. Jour. Vet. Res. 20:148-153.
87. _____ J. WALKER. 1960. Characterization of Vibrio fetus antigen. III. Study of serologic and biophysical properties of polysaccharide fraction in a hemolytic system. Amer. Jour. Vet. Res. 21:884-889.
88. ROBERTSTAD, G.W. and S.M. MORRISON. 1957. An improved method for the rapid cultivation of large yields of Vibrio fetus. Amer. Jour. Vet. Res. 18:705-707.
89. SAMUELSON, J.D. and J.A. WINTER. 1966. Bovine vibriosis the nature of the carrier state in the bull. Jour. Infec. Dis. 116:881-892.
90. SCHIMMELPFENNING, H. and E. MITSCHERLICH. 1965. The use of fluorescent serologic in bacteriological diagnosis. I. Differentiation of Vibrio fetus from Vibrio eltor by fluorescent antibody. Biol. Abst. 46(12):53620.
91. SEAMON, P.J. 1968. Membrane filtration technique for the isolation of Vibrio sp from contaminated material. Jour. Med. Lab. Tech. 25(1):25-26.

92. SHEPLER, V.M.; C.J. PLUMMER and J.E. FABER. 1963. Isolation of Vibrio fetus from bovine preputial fluid, using Millipore filters N and an antibiotic medium. Amer. Jour. Vet. Rese. 24:749-755.
93. SMIBERT, R.M. 1965. Vibrio fetus var intestinalis isolated from fecal and intestinal content of clinically normal sheep: isolation of microaerophilic vibrios. Amer. Jour. Vet. Rese. 26:315-319.
94. _____. 1965. Vibrio fetus var intestinalis isolated from fecal and intestinal content of clinically normal sheep: biochemical and cultural characteristics of microaerophilic vibrios isolated from the intestinal contents of sheep. Amer. Jour. Vet. Rese. 26:320-327.
95. SMITH, T. 1918. Spirilla associated with diseases of the fetal of the fetal membranes of cattle. Exp. Med. 28:701-720.
96. _____ M.S. TAYLOR. 1919. Some morphological and biological characters of the spirilla (Vibrio fetus) associated with disease of the fetal membranes in cattle. Jour. Exp. Med. 30:299-312.
97. Spink, W.W. 1957. Human vibriosis caused by Vibrio fetus. Jour. Amer. Vet. Med. Assn. 130:243.

98. STOCKTON, J.J. and J.P. NEWMAN. 1950. The preservation of Vibrio fetus by lyophyllization. Cornell Vet. 40:377-379.
99. TAUL, L.K. and A.L. KLECKNER. 1968. Fluorescent antibody studies of Vibrio fetus. Staining characteristics in semen and preputial exudate and pure culture. Amer. Jour. Vet. Rese. 29(3):711-715.
100. TRUEBLOOD, M.S. and J.O. TUCKER. 1957. An improved medium for the cultivation of Vibrio fetus. Amer. Jour. Vet. Rese. 18:445-448.
101. WEBSTER, H.D. and F.A. THORP. 1953. A study of the pathology of embryonating eggs inoculated with Vibrio fetus. Amer. Jour. Vet. Rese. 14:118-122.
102. WINTER, A.J. and H.W. DUNN. 1962. An antigenic analysis of Vibrio fetus. I. Properties of soluble extracts of the organisms. Amer. Jour. Vet. Rese. 23:150-158.
103. _____ K. BURDA and H.O. DUNN. 1965. An evaluation of cultural technics for the detection of Vibrio fetus in bovine semen. Cornell Vet. 55:431-443.
104. _____. 1965. Characterization of antibody for Vibrio fetus endotoxin in sera in normal and Vibrio fetus infected cattle. Jour. Immunol. 95(6):1002-1012.

105. _____. 1966. An antigenic analysis of Vibrio fetus.
III. Chemical biologic and antigenic properties of the
endotoxin. Amer. Jour. Vet. Rese. 27:653-658.
106. _____ J.D. SAMUELSON and M. ELKANA. 1967. A comparison of
immunofluorescence and cultural technique for demonstration
of Vibrio fetus. Jour. Amer. Vet. Med. Assn. 150(5):499-502.
107. ZEMJANIS, R. and J.H. HOYT. 1960. The effects of growth factors
on the growth of Vibrio fetus. Amer. Jour. Vet. Rese. 21:1109-
1113.
108. _____ H.H. HOYT. 1960. The effect of enzyme inhibitors on a
Vibrio fetus, Proteus vulgaris and Pseudomonas aeruginosa.
Amer. Jour. Vet. Rese. 21:1066-1074.