

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**DETERMINACIÓN DE LA FLORA BACTERIANA
AERÓBICA NORMAL EN VAGINA DE VAQUILLAS**

POR
THELMA YADIRA AVALOS LÓPEZ

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA, MEXICO

JUNIO 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**DETERMINACIÓN DE LA FLORA BACTERIANA
AERÓBICA NORMAL EN VAGINA DE VAQUILLAS**
TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

POR

THELMA YADIRA AVALOS LÓPEZ

ASESOR PRINCIPAL

MC. MARGARITA YOLANDA MENDOZA RAMOS

TORREÓN, COAHUILA, MEXICO

JUNIO 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



TESIS

DETERMINACIÓN DE LA FLORA BACTERIANA
AERÓBICA NORMAL EN VAGINA DE VAQUILLAS

Tesis Aprobada por el

PRESIDENTE DEL JURADO

MC. MARGARITA YOLANDA MENDOZA RAMOS

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL
DE CIENCIA ANIMAL

MC. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ



Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

TORREÓN, COAHUILA; MEXICO

JUNIO 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



TESIS

DETERMINACIÓN DE LA FLORA BACTERIANA
AERÓBICA NORMAL EN VAGINA DE VAQUILLAS

TESIS APROBADA POR EL H. JURADO EXAMINADOR

Mendoza

MC. MARGARITA YOLANDA MENDOZA RAMOS

PRESIDENTE

Corona

MC. JOSÉ LUIS CORONA MEDINA

VOCAL

Sánchez

MVZ. MARÍA GUADALUPE SÁNCHEZ LOERA

VOCAL

Olvera

QFB. LAURA ILEANA OLVERA DENA

VOCAL SUPLENTE

Dedicatoria

Dedico este trabajo con toda mi gratitud a quienes recorrieron mi camino por la universidad a mi lado: mis compañeros, mis amigos, mis maestros y en especial a mi esposo Rubén Ochoa Beltrán y a mi hija Shanti Esmeralda Ochoa Avalos. Sin su compañía a lo largo de estos años hubiera sido difícil lograr mi sueño. A Frida mi perra labrador de quien guardo un especial recuerdo y quien también recorriera junto a mí los pasillos de la universidad.

Agradecimientos

En especial a mi familia que ha estado a mi lado impulsándome para cumplir una meta más en mi vida de ser Médico Veterinario Zootecnista.

A mis asesores de tesis MC Margarita Yolanda Mendoza Ramos y MC José Luis Corona Medina que confiaron en mí para la realización de este proyecto. A MVZ Olivia García Morales y MVZ Guadalupe Sánchez Loera por su gran apoyo y asesoría.

A una gran amiga Elda Azalia Escápita Ramos por su ayuda para la realización de este trabajo, pero sobre todo por su amistad incondicional, asesoría, motivación que siempre me brindo.

A María Cristina Morán García y Octavio Cruz Marmolejo que siempre me brindaron su amistad.

A mis maestros que sin duda dejaron una marca en mi carrera: Ernesto Martínez Aranda, Hilda Sagredo de Martínez, José Luis Corona Medina, Margarita Yolanda Mendoza Ramos, Pedro Antonio Robles Trillo, Ezequiel Castillo Romero y a mi tutor por 5 años Sergio Ignacio Barraza, Gracias a todos por sus consejos.

A mi casa de estudios la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro - UL, la cual me brindo lo necesario para realizarme como profesionista.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Resumen	
Introducción	1
Marco Teórico	2
Flora Normal de la vagina	2
Factores que la alteran la flora vaginal	5
Consecuencias de la alteración de los microorganismos	6
Microorganismos que forman parte de la flora vaginal de vacas	7
Problemas de infertilidad	9
Anatomía y Fisiología	9
Hipótesis	11
Objetivo	11
Materiales y Métodos	12
Animales experimentales	12
Recolección y Transporte de muestra	12
Procesamiento de las Muestras	13
Identificación y aislamiento de colonias	13
Pruebas Bioquímicas	14
Resultados y Discusiones	15
Conclusión	21
Recomendaciones	22
Literatura Citada	23

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	15
Edad de la población de vaquillas en porcentaje	
Figura 2.	16
Ocurrencia de aislamiento de Enterobacterias	
Figura 3.	17
Ocurrencia de aislamientos de bacterias Gram positivos	

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	10
Inicio de pubertad y edad recomendada a servir según su raza.	
Cuadro 2.	15
Rango de edad de las vaquillas	
Cuadro 3.	16
Resultados obtenidos en las pruebas de identificación de bacterias Gram negativas entéricas, a partir de hisopados vaginales en vaquillas sin exposición al toro y/o inseminación	
Cuadro 4.	18
Frecuencia de bacterias aerobias aisladas de hisopados vaginales de vaquillas clínicamente sanas no expuestas a toro y/o inseminación artificial	

RESUMEN

Se determinó mediante cultivo la presencia bacteriana aerobia de la vagina en 50 vaquillas las cuales no se habían expuesto al toro y/o inseminaron, tomadas al azar del Centro de Crianza “El Refugio” del municipio de Gómez Palacio, Dgo.

Las muestras para cultivo se realizaron a partir de los hisopados vaginales realizados con las medidas de higiene requeridas, fueron transportadas en medio Stuart hasta el Laboratorio de Microbiología en la Unidad de Diagnóstico de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro-UL. Las muestras fueron sembradas en Agar Sangre, Agar Sal y Manitol, Agar Eosina y Azul de Metileno y Agar McConkey las cuales se incubaron a 37°C por 24 – 48 horas.

Se evaluaron las características macroscópicas y microscópicas, mediante la realización de la tinción de Gram. Luego a las colonias de los cultivos se aislaron en Agar Métodos Estándar y Agar Bilis Rojo Violeta, para la realización de pruebas bioquímicas.

Se aislaron microorganismos aerobios potencialmente patógenos, saprofíticos y otros que se han demostrado ser patógenos. Las bacterias aerobias aisladas con mayor frecuencia fueron *Escherichiacoli* 74%, *Staphylococcus* spp. 74%, *Klebsiella* spp. 32%, *Mannheimia haemolytica* 26%, *Pseudomonaaeruginosa* 24% y *Streptococcus* spp. 22%.

PALABRAS CLAVES

Vaquilla, Hisopado vaginal, Flora vaginal, Bacterias aerobias, Enterobacterias.

INTRODUCCIÓN

La infertilidad en el ganado bovino es un problema muy importante por ser la principal causa de pérdidas en la producción animal. La falla de una hembra para producir un cría después del apareamiento o la inseminación, por fallas en la ovulación, fecundación o en el desarrollo del embrión reduce la eficiencia de producción por el aumento en el número de días requeridos para lograr una concepción, la infertilidad durante la época de reproducción reduce la probabilidad de que una vaca produzca una cría en la siguiente temporada de pariciones (Warnick y Hansen, 2010). La fertilidad en las vacas es afectada por muchos patógenos específicos y no específicos del tracto genital

En las zonas pecuarias que tienen climas tan extremos como el que existe en la Comarca Lagunera, Hoving (2009) reporta que además de las causas infecciosas existen otros factores que influyen en la fertilidad de un hato, entre esos factores se encuentra el estrés calórico, este afecta la conducta reproductiva en el ganado, y generalmente causa problemas de concepción, más que abortos.

Este trabajo evaluara la flora aerobia que habita en la vagina de hembras bovinas que no han sido expuestas a ningún proceso de inseminación.

MARCO TEÓRICO

FLORA NORMAL DE LA VAGINA

La definición de la flora bacteriana normal animal puede variar. En general, las bacterias de la flora normal se puede dividir en: simbióticas que se benefician a sí mismas y al hospedero, en comensales – que no parecen ser de algún beneficio para el hospedero y oportunistas que lo pueden perjudicar y producir enfermedad en determinadas circunstancias (Sorum y Sunde, 2001).

El organismo del animal no puede considerarse como un hábitat microbiano uniforme. Cada región difiere de las otras creando así un ambiente selectivo donde ciertos microorganismos son favorecidos más que otros. La piel, la cavidad oral, tracto gastrointestinal, el tracto respiratorio y el tracto genitourinario son ambientes donde las condiciones favorecen ciertos tipos de microorganismos (Sorum y Sunde, 2001).

Aunque algunas barreras físicas evitan que los agentes patógenos oportunistas colonicen el tracto genital, las hembras pueden ser susceptibles a los microorganismos que pasan a través del cuello uterino y llegan al útero (Rocha *et al.*, 2004; Boscan *et al.*, 2010). Los microorganismos normales de la vagina se vuelven patógenos cuando se ve comprometido el sistema inmunológico, debido a la tensión causada por diversos factores tales como mala nutrición y cambios bruscos de temperatura (Rocha *et al.*, 2004; Alba y Silveira, 2006; Boscan *et al.*, 2010).

El tracto genital de las hembras posee flora bacteriana en casi toda su extensión, a excepción del útero, ya que allí por lo general no habitan microorganismos, aunque esto puede variar de acuerdo con el estatus inmunológico del animal (Sánchez *et al.*, 2011).

En condiciones normales, en las características de composición de la microbiota vaginal un número variable de los microorganismos encontrados en la piel y también los que están presentes en las heces, tienen propiedades

invasivas y pueden estar en números pequeños en el útero de vacas sanas. Las vacas no sufren contaminación continua con estos agentes, sin embargo colonizan el tracto genital si surge la oportunidad (Rocha *et al.*, 2004).

El cuerpo de los mamíferos debido a que se mantienen estables en cuanto a la temperatura, humedad, presencia de nutrientes (Alba y Silveira, 2006; Fernández *et al.*, 2006; Boscan *et al.*, 2010) y su pH en la vagina entre valores de $6,92 \pm 0,51$ y el del cuello uterino entre $6,22 \pm 0,31$ (Alba y Silveira, 2006), lo que provee un hábitat favorable para una gran cantidad y variedad de microorganismos (Alba y Silveira, 2006; Fernández *et al.*, 2006). Esta gran mezcla de microorganismos adaptada al cuerpo del animal recibe el nombre de microflora, aunque el término más preciso es el de microbiota (Alba y Silveira, 2006; Fernández *et al.*, 2006).

La microbiota residente está compuesta de tipos relativamente fijos de gérmenes, los cuales se encuentran consistentemente en un sitio dado a una edad dada; si se trastorna, se restablece espontáneamente con rapidez (Alba y Silveira, 2006).

La microbiota normal de la vagina presenta una flora microbiana mixta, compuesta por microorganismos aerobios, anaerobios facultativos y anaerobios estrictos. Esta mezcla de microorganismos incluyen a los saprofitos, patógenos potenciales y oportunistas (Alba y Silveira, 2006; Fernández *et al.*, 2006; Resende *et al.*, 2007; Boscan *et al.*, 2010), ellos están adaptados al modo de vida no invasivo, determinados por las limitaciones del ambiente, es decir, pueden proliferar y producir enfermedades si son introducidos en lugares extraños (Boscan *et al.*, 2010).

Los microorganismos que están siempre presentes en un lugar del cuerpo son comensales en forma de simbiosis que se caracteriza por la asociación mutua pero casi indiferente entre bacterias y organismos superiores. Por ejemplo las bacterias normalmente presentes en la mucosa uterina son comensales

aunque algunas cepas sean, dicho más exactamente, oportunistas (Alba y Silveira, 2006).

La microbiología normal de la vagina está compuesta en su mayoría por bacterias y en una menor proporción por hongos, consignando que las bacterias más comunes son las aerobias, entre ellas, las del grupo de los *Staphylococcus*, *Streptococcus* y Coliformes (Resende *et al.*, 2007; Boscan *et al.*, 2010). Asimismo, las anaerobias juegan un papel interesante en la microflora vaginal de la vaca. Entre las más señaladas se encuentran, las del género *Lactobacillus*, *Fusobacterium* y *Peptostreptococcus*; en un menor grado, se han aislado hongos del género *Aspergillus* y *Penicillium*. Otro microorganismo de carácter facultativo en cuanto a exigencias de oxígeno para su crecimiento es el *Arcanobacterium pyogenes*, reportado por varios autores (Boscan *et al.*, 2010).

Es esencial tener algún conocimiento de la microbiota normal para poder juzgar el significado probable de los gérmenes aislados (Alba y Silveira, 2006; Fernández *et al.*, 2006).

FACTORES QUE LA ALTERAN LA FLORA VAGINAL

Hay muchos factores que directa o indirectamente influyen en la reproducción de vacas, entre las principales causas mas comunes se encuentra las infecciones del tracto reproductor de la hembra, en especial, la contaminación del útero con microorganismos patógenos o potencialmente patógenos, que poseen una gran importancia (Fernández *et al.*, 2006; Ata *et al.*, 2010). El grado de contaminación uterina está estrechamente relacionado con el ambiente microbiano del lugar y se favorece cuando concurren ciertos factores predisponentes relacionados con la higiene, el tipo de parto, la atención al puerperio, entre otros (Fernández *et al.*, 2006).

La vagina por ser la parte del tracto reproductivo más expuesta, posee mayor número de bacterias, entre las cuales se pueden encontrar Gram negativas y Gram positivas (Sánchez *et al.*, 2011).

CONSECUENCIAS DE LA ALTERACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

Se sabe que las infecciones genitales bovinas, de naturaleza específica o no específica, son responsables del gran número de fallas en la preñez en vacas. En general, las infecciones inespecíficas de los órganos genitales se considera que son la causa principal de falla en la concepción repetida, donde hay un aumento en el número de microorganismos y/o en su virulencia (Gani *et al.*, 2008).

Inmediatamente después del parto, al estar dilatado del cuello del útero permite que microorganismos del ambiente, la piel de vaca, y la materia fecal se introduzcan a través de la vagina hacia el útero e inician la inflamación del endometrio, que está altamente asociada con la infertilidad (Wang *et al.*, 2013).

La infección bacteriana es la más importante entre las diversas causas de la subfertilidad. Esta condición puede causar cervicitis o endometritis de varios grados (Gani *et al.*, 2008) y piometra (Fernández *et al.*, 2006), que a su vez pueden conducir a la muerte embrionaria y problemas repetitivos en la producción. Estas infecciones afectan a la fertilidad mediante la alteración del ambiente uterino resultando en el deterioro del transporte espermático, muerte de espermatozoides y el ambiente hostil para el posterior desarrollo y el mantenimiento del embrión que conducen a su muerte, que a su vez provoca pérdidas económicas a la industria lechera (Gani *et al.*, 2008).

MICROORGANISMOS QUE FORMAN PARTE DE LA FLORA VAGINAL DE VACAS

Pocos estudios han indicado que las infecciones bacterianas con manifestaciones clínicas inespecíficas significativas o la sintomatología inaparente son responsables de muchos casos de infertilidad en la vaca. Los estudios sobre la microflora del moco cervico-vaginal, el cuello uterino y la vagina anterior de vacas normales y reproductoras de repetición han demostrado un amplio espectro de la microflora (Panangala y Barnum, 1978).

La flora microbiana normal del tracto urogenital bovino se compone de una mezcla dinámica de microorganismos anaerobios estrictos y anaerobios facultativos y aerobios (Otero *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2013).

Panangala y Barnum (1978), mencionan el aislamiento de estafilococo, estreptococo, especies de *Escherichiacoli*, *Corynebacterium*, *Haemophilus*, *Proteus* y *Bacillus*. Con menos frecuencia micoplasmas y agentes micóticos se han reportado con significación dudosa.

Los microorganismos comúnmente aislados de las muestras obtenidas del tracto reproductor son patógenos o saprófitos potencialmente patógenos. La flora microbiana normal de esta zona está compuesta por bacterias de los géneros estafilococo, estreptococo y el grupo coliforme (Otero *et al.*, 2000; Rocha *et al.*, 2004). Boscanet *et al.* (2010), mencionó que los aislamientos bacterianos aerobios más frecuentes que obtuvieron fueron: *Trueperellapyogenes*, *Staphylococcusepidermidis*, *Erysipelothrixrhusiopathiae*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichiacoli*.

Sánchez *et al.* (2011), mencionan que las bacterias aisladas del tracto reproductivo se clasifican principalmente en cuatro grupos: bacterias Gram positivas, Gram negativas, ácido-alcohol resistente y bacilos esporoformadores. En las primeras se agrupan los géneros *Staphylococcus* spp.,

*Streptococcus*spp., *Lactobacillus*spp., y *Enterococcus*spp.; el grupo de las Gram negativas está conformado por *Pseudomonas*spp, *E.coli*, *Klebsiella*spp., *Proteus*spp.y *Prevotella*spp.; *Trueperella*pyogenes(*Arcanobacterium*pyogenes, *Actinomyces*pyogenes, *Corynebacterium*pyogenes) como ácido-alcohol resistente, y entre los bacilos esporoformadores asociados a problemas reproductivos está el género *Clostridium*spp.; otro microorganismo reportado en menor proporción es *Mycoplasma*spp.que se caracteriza por la ausencia de pared celular

Yassin *et al.* (2011), reclasificó *Arcanobacterium*pyogenes en un nuevo grupo llamado *Trueperella*, basándose en estudios filogenéticos y taxonómicos.

PROBLEMAS DE INFERTILIDAD

ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA

Un manejo reproductivo eficiente de la vaca lechera requiere un apropiado entrenamiento para sentar buenas bases del éxito. Lamentablemente en muchos casos esto pasa inadvertido por los dueños, ya que es frecuente pensar que por que se envió al empleado a tomar un curso de inseminación artificial (IA) ya cuenta con un mejor nivel de manejo reproductivo, ignorando si entiende los conceptos básicos de la anatomía y la fisiología de la reproducción, el manejo y el confort de las vacas lecheras, incluyendo algunas cosas más complejas como la interacción entre la reproducción, las instalaciones, la nutrición, y/o los sistemas para reducir el estrés calórico, entre otros (Rivera,2009).

Araujo (2004) define a la pubertad con el período del desarrollo somático de un individuo joven que alcanza la madurez sexual, teniendo valores normales de gonadotropinas, evolución completa de los genitales y caracteres sexuales secundarios, haciéndose apto para la gestación. Hay folículos maduros capaces de mantenerse, e igualmente la presencia de un cuerpo lúteo.

En general las hembras bovinas alcanzan la pubertad entre los 7 y los 18 meses de edad. Las becerras lecheras alcanzan la pubertad, definida como la habilidad de las hormonas hipotalámicas de producir la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en elevadas y constantes cantidades cerca de los 7 o 9 meses de edad (Rivera,2009). Little *et al.* (1981), citado por Montiel (1993), calcula que las novillas comienzan una vida reproductiva entre los 15 y 17 meses.

Rivera (2009), muestra una tabla donde se observa como es que influyen la raza y la edad sobre el inicio de la pubertad, así como las edades recomendadas para servir becerras lecheras y de carne.

Cuadro 1. Inicio de pubertad y edad recomendada a servir según su raza (Rivera, 2009).

Raza	Inicio de la pubertad (m)	Edad recomendada
Holstein	9	14 – 15
Suiso	12	14 -15
Shorthorn Lechero	8 -11	14 -15
Guernsey	11	14 -15
Ayrshire	13	14 -15
Jersey	8	12 -13
Angus	12	15
Hereford	13	15
Cebu	19 -24	24

Los factores que influyen en la pubertad son la raza, plano de nutrición, crecimiento y clima (Bastidas, 1999; Rivera, 2009). Con respecto a la edad y el peso que se requieren para alcanzar la pubertad se encuentra una amplia diferencia entre razas e incluso dentro de una misma raza, ya que pueden ser minimizados por el efecto de las condiciones ambientales y de manejo es muy difícil establecer unos parámetros e incluso poder llegar a comparaciones entre razas. Se considera que esta se obtiene en el 65 - 50% del peso adulto en novillas de razas cárnicas, mientras que en las novillas de actitud lechera la edad tiene lugar entre 45 – 55% del peso adulto (Araujo, 2004).

El mecanismo fisiológico y anatómico de cierre al momento del parto resultan temporalmente insuficientes y las bacterias que normalmente habitan la región perianal y vulvar, pueden ascender y causar infecciones. Asimismo, intervenciones como la inseminación artificial, el coito y los exámenes obstétricos, pueden incrementar el riesgo de introducción de bacterias en el útero. Otros factores predisponentes son el estrés, la alta producción, enfermedades metabólicas y carenciales (González y Mattar, 2007).

HIPÓTESIS

Las bacterias aerobias más comunes que se encuentran en el tracto genital de vaquillas son de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* y del grupo denominado Coliformes.

OBJETIVO

Determinar la microflora bacteriana aerobia presente en la vagina sana en vaquillas momentos antes de entrar al programa de sincronización para ser inseminadas. Con el fin de establecer la importancia de los gérmenes cervicales aislados.

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES EXPERIMENTALES

Se tomaron un total de 50 muestras en el mismo número de vaquillas, pertenecientes al establo “Centro de Crianza El Refugio” localizado en el municipio de Gómez Palacio, del estado de Durango, el establo cuenta con una población promedio de 3,204 cabezas de ganado, de las cuales solo son vaquillas por inseminar en promedio 830, se tomaron 50 muestras de hisopado vaginal, que equivalen a un 6%. Las vaquillas fueron tomadas al azar de los grupos separados para la programación previa a la inseminación, las cuales deberían cumplir con los siguientes criterios de inclusión: tener una condición corporal de 3 a 3.5 en una escala del 1 al 5, para garantizar un óptimo estado nutricional; no haber sido inseminada o expuesta al toro; y además de un retiro de mínimo 3 semanas a cualquier tratamiento que hubiera tenido.

RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRA

Para la toma de muestra, se introdujeron las vaquillas en la trampa para el manejo de ganado para restringir sus movimientos, para tomar la muestra sin exponerse a alguna lesión, se procedió al lavado de la zona del ano, vulva, región perineal y la base de la cola con abundante agua limpia, jabón de polvo y cepillo de cerdas suaves, y se aplicó una solución desinfectante a base de cloruro de benzolconio, secando el excedente con papel absorbente. Una vez desinfectada el área a trabajar se procedió a la toma de la muestra, acoplado un hisopo estéril de 15cm de longitud a una funda sanitaria nueva (utilizada en la inseminación artificial) y con guantes desechables se abrieron los labios vulvares con el fin de introducir el hisopo estéril hacia la vagina evitando tocar la zona exterior y las paredes de la misma vagina, hasta llegar cerca del cérvix y con movimientos circulares tomar la muestra de las paredes de la misma. Posteriormente se sacó el hisopo con sumo cuidado evitando nuevamente tocar otras zonas y se introdujo éste en un tubo de ensaye con medio de transporte Stuart el cual es propicio para microorganismos aerobios, una vez rotulado con el número del animal se mantuvo en refrigeración para su conservación

colocada en una gradilla para inmovilizarlo, se introdujo en una hielera con refrigerantes para poder ser trasladadas al laboratorio de microbiología y procesarlas en no más de una hora.

A cada muestra previa a la siembra, se le realizó un extendido y se hizo la tinción de Gram para determinar el tipo de bacterias que pudieran estar presentes en el cultivo.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Microbiología en la Unidad de Diagnóstico de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro-UL. Las muestras se sacaban de la hielera y eran puestas en un área la cual era previamente limpiada y desinfectada, la gradilla se colocada cerca de uno de los mecheros Fisher para evitar contaminación, y dentro de un radio de 20cm con el otro mechero se procedía a realizar a cada muestra de hisopo un extendido (directo) en una laminilla previo a su cultivo, se les hizo la tinción de Gram, esto con la finalidad de determinar que tipo de bacterias son las que pueden estar presentes en las siembras posteriores. Se realizó el estriado con ayuda de una asa de cada hisopada en los diferentes medios: Agar Sangre, Agar Sal y Manitol, Agar Eosina y Azul de Metileno y Agar McConkey bajo condiciones previamente estandarizadas, se incubaron a 37°C, se observaron cada caja Petri a las 24 horas y se tomaba nota de las que tenían crecimiento, las que no contaban con este se dejaban hasta las 48 horas para su lectura.

IDENTIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DE COLONIAS

Una vez observada la presencia de crecimiento bacteriano, se evaluaron y se tomó nota de las características macroscópicas (tamaño, forma, borde, superficie, color, aspecto, consistencia y hemólisis) se procedió a observar en

el microscopio las características microscópicas dadas por la tinción de Gram. Se realizaron aislamientos en Agar Métodos Estándar y Agar Bilis Rojo Violeta los cuales se habían dejado solidificar inclinados en un tubo se refrigeraron bajo condiciones estandarizadas, para la realización posterior de las pruebas bioquímicas necesarias para la correcta identificación de cada microorganismo.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Las pruebas que se realizaron son aquellas previamente estandarizadas, siguiendo las técnicas señaladas por Mac Faddin (1980). Se realizó la prueba de catalasa que tiene como propósito diferenciar *Streptococcuspp.*, de *Staphylococcuspp.*, ya que ambos son cocos Gram positivos. Así como las principales pruebas empleadas para la diferenciación de las bacterias aerobias, que conforman la familia de las enterobacterias. Las pruebas realizadas fueron:

- TSI (Agar Hierro Triple Azúcar), esta prueba muestra la producción de ácido sulfhídrico, la habilidad de los microorganismos para fermentar azúcares (glucosa, lactosa y sacarosa) así como su capacidad de producir gas.
- MIO (Motilidad IndolOrnitina), para determinar si un organismo es móvil o no y demostrar la capacidad del organismo para dividir el indol de la molécula de triptófano con ayuda del reactivo de Kovac.
- LIA (Agar Lisina), utilizamos esta prueba para confirmar la fermentación de glucosa.
- Urea. Determina la habilidad de un organismo para dividir la urea por medio de la enzima ureasa, formando dos moléculas de amoníaco.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Las vaquillas que les fue tomada la muestra de hisopado vaginal, fueron en su mayoría de 12 meses (Cuadro 2.), siendo un 64% de las vaquillas tomadas al azar, de 13 meses fue el 28% y de 14 y 15 meses el resto (Fig. 1).

Cuadro 2. Rango de edad de las vaquillas

Edad en meses	No. De vaquillas
12	32
13	14
14	3
15	1
Total	50

En el estudio se encontró que las vaquillas que fueron tomadas al azar del grupo que se encontraba separado para la sincronización, estaban entre 12 y 15 meses de edad, siendo más de la mitad de 12 meses y con un peso aproximado a 430kg. Rivera (2009) menciona que alcanzan la pubertad cerca de los 7 o 9 meses de edad, pero Montiel (1993) calcula que las novillas comienzan una vida reproductiva entre los 15 y 17 meses, que es cuando son aptos para la gestación.

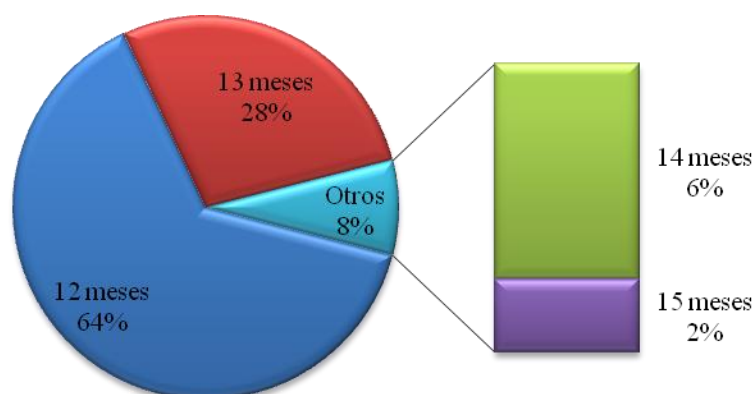


Figura 1. Edad de la población de vaquillas en porcentaje.

Para la confirmación de identificación de bacterias Gram negativas de las muestras tomadas de los hisopados, se realizaron las pruebas bioquímicas y los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 3.

Cuadro 3. Resultados obtenidos en las pruebas de identificación de bacterias Gram negativas entéricas, a partir de hisopados vaginales en vaquillas sin exposición al toro y/o inseminación

BACTERIA	MC	MIO		LIA	TSI		UREA
	LACTOSA	INDO L	MOVILIDA D	GLUCOSA	GAS	FERMENTACION	
<i>Shigella</i> spp.	-	-	-	+	+	+	-
<i>Salmonella</i>	-	-	+	+	+	+	-
<i>Klebsiella</i>	+	-	-	-	+	+	+
<i>Proteus</i>	-	+	+	+	-	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	+	-	-	-	-

Un grupo importante de aislamiento son las enterobacterias, en la figura 2, se muestran los datos obtenidos, donde el aislamiento más significativo fue *Escherichia coli*.

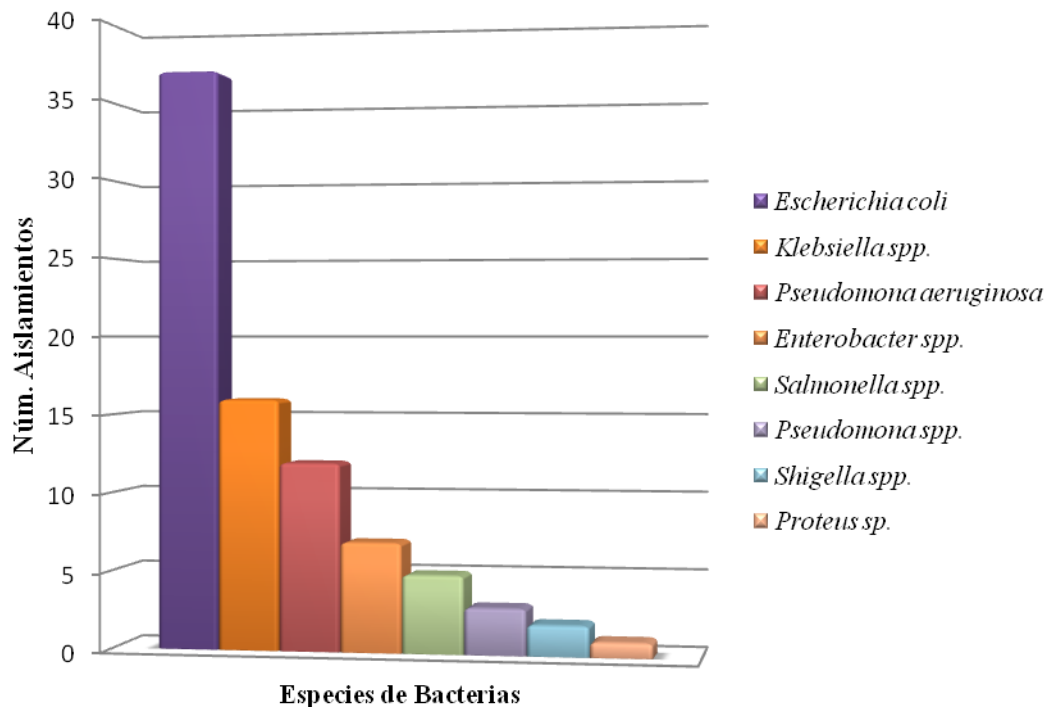


Figura 2. Ocurrencia de aislamiento de Enterobacterias.

En la figura 3, se muestran los aislamientos que se obtuvieron de las muestras de hisopados vaginales, donde solo 40 de las vaquillas de las 50 presentaron una o más bacterias Gram positivo.

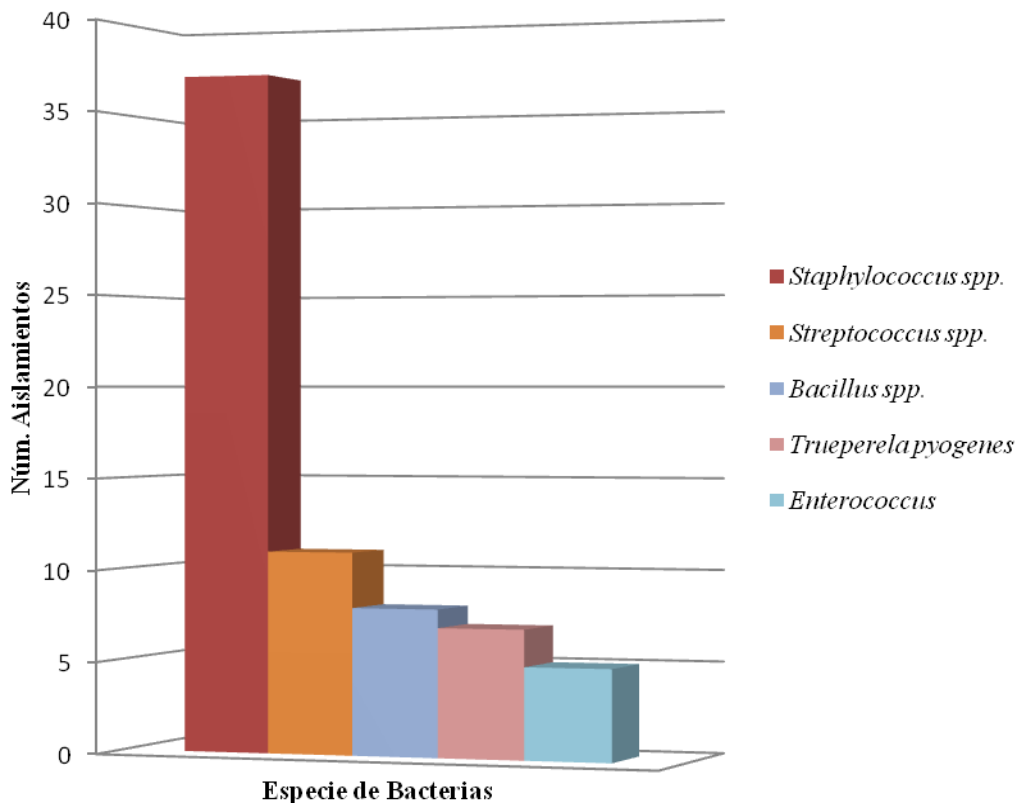


Figura 3. Ocurriencia de aislamientos bacterianos Gram positivos

Las bacterias aerobias aisladas con mayor frecuencia fueron *Escherichia coli*, *Staphylococcus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Mannheimia haemolytica*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus spp.* El total de especies de bacterias aerobias aisladas están representadas en el cuadro 4.

Cuadro 4. Frecuencia de bacterias aerobias aisladas de hisopados vaginales de vaquillas clínicamente sanas no expuestas a toro y/o inseminación artificial

Género	Frecuencia	Total de Vaquillas	Ocurrencia en %
<i>Escherichiacoli</i>	37	50	74
<i>Staphylococcusspp.</i>	37	50	74
<i>Klebsiellaspp.</i>	16	50	32
<i>Mannhemiahaemolytica</i>	13	50	26
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	12	50	24
<i>Streptococcusspp.</i>	11	50	22
<i>Bacillus spp.</i>	8	50	16
<i>Trueperella pyogenes</i>	7	50	14
<i>Enterobacter spp.</i>	7	50	14
<i>Pasteurella multocida</i>	6	50	12
<i>Enterococcus</i>	5	50	10
<i>Salmonella spp.</i>	5	50	10
<i>Pseudomonas spp.</i>	3	50	6
<i>Shigella spp.</i>	2	50	4
<i>Proteus spp.</i>	1	50	2
TOTAL	170		

Similares resultados han sido reportados por autores diversos, estas bacterias se han aislado en estudios anteriores según las referencias de Panangala y Barnum, (1978), Otero *et al.*(2000), Rocha *et al.* (2004), Alba y Silveira (2006), Fernández *et al.* (2006), Boscanet *al.* (2010), Sánchez *et al.* (2011). El alto número de microorganismos aislados en los hisopados vaginales de vaquillas vírgenes muestra una microflora vaginal saprofítica la cual se considera normal. Esta microflora, a pesar de no producir enfermedad en el animal, está representada por bacterias saprofitas, patógenos potenciales y oportunistas (Alba y Silveira, 2006; Fernández *et al.*, 2006).

Un grupo de bacterias aisladas en este estudio fueron las enterobacterias, reflejando una ocurrencia del 83% del total de bacterias, presentándose en el

88% de las vaquillas muestreadas. En un estudio en cérvix de vacas, se reportaron un 47.1% de enterobacterias (Fernández *et al.*, 2006), algo muy parecido con lo encontrado por Alba y Silveria (2006) que reportaron una ocurrencia de enterobacterias de 41.5% en vaginas clínicamente sanas. Panangala y Barnu (1978), solo el 36%, corresponden a enterobacterias en su estudio. En otro hallazgo se aisló en menor porcentaje, Boscan *et al.* (2010), encontró solo el 9% de esta clasificación en su estudio. Caso contrario, en hallazgos provenientes de vaginas clínicamente sanas de novillas, se encontraron niveles bajos de enterobacterias de 10^0 a 10^2 UFC durante el periodo de estudio (Otero *et al.*, 2000).

Klebsiella spp. es una bacteria que se encuentra como flora habitual en el tracto reproductivo y su naturaleza no causa alteraciones o problemas reproductivos (Fernández *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2011). El estudio realizado en Montería, Colombia se identificó a *Klebsiella* spp. en un 32.4% de los casos como una bacteria que hace parte de la flora acompañante en vacas sin relacionarse a patologías del tracto genital en bovinos (González y Mattar, 2007), a lo que difiere de lo observado en este estudio, donde el aislamiento fue bajo (9.4%), que se encontró en el 32% de las vaquillas muestreadas.

Resende *et al.* (2007), menciona que si bien *E. coli* es un importante agente de infección del tracto urinario en perros y cerdos, no tiene tanta importancia en bovinos, en los que la frecuencia de infección del tracto urinario es bajo. No obstante, según el mismo autor *E. coli* es bien conocido por causar endometritis y la infertilidad en el ganado vacuno, aislando 71 aislamientos de 15 muestras vaginales de vacas lecheras. En los aislamientos realizados por nosotros se observaron *E. coli* en el 47% del total de vacas muestreadas. En estudios similares se reportan el 28.1% (Fernández *et al.*, 2006), 22.2% (González *et al.*, 2007) y un 11.01% (Boscan *et al.*, 2010). A pesar de que *E. coli* es considerado habitante normal del cérvix y vagina en bovinos (Panangala y Barnum, 1978; González *et al.*, 2007), este puede convertirse en un germen oportunista altamente patógeno y de gran importancia en el desarrollo de infertilidad y otras

afecciones en el ganado bovino (Fernández *et al.*, 2006;González *et al.*, 2007;Boscan*et al.*, 2010).

Por otra parte se encontró que solo el 4% del total de bacterias eran *T. pyogenes*. Algunos autores mencionan que *T. pyogenes* es uno de los principales gérmenes bacterianos oportunistas de la vagina, que sólo espera condiciones favorables como la alteración de los mecanismos fisiológicos de defensa de la vagina y el útero, de esta manera debilitándose la resistencia local y sistémica de la vaca (Alba y Silveira, 2006;Fernández *et al.*, 2006;Boscan*et al.*, 2010). Bajo este ambiente, la virulencia aumenta y la proliferación de la bacteria es iniciada dejando su papel de oportunista para convertirse en patógeno. Roppel y Campero (1998) reportan la asociación de *T. pyogenes* con *E. coli* como causante de infecciones uterinas presente en el tracto genital en alta proporción de vacas recién paridas en el 90% de las vacas, eliminándolo durante los primeros 10 días post parto. Las inadecuadas medidas de higiene del medio ambiente y el estrecho contacto entre los animales aumenta el riesgo de que esté presente. Además menciona que si bien es un habitante común de las mucosas y es factible de ser encontrado en la vagina de vacunos normales, puede producir bacteriemia.

Además, según Alba y Silveira (2006), muchos de los gérmenes de la microbiota normal exacerban su virulencia cuando son acompañados por otros microorganismos del medio externo, dando origen a un cuadro infeccioso.

CONCLUSIÓN

Se confirmó la presencia de las bacterias aerobias en la vagina, esto acorde con la hipótesis que se tenía. Los hallazgos permiten demostrar que en la vagina aparentemente sana de vaquillas, residen microorganismos aerobios saprofitos la cual se puede considerar normal y microorganismos aerobios con potencial de patogenicidad, como lo es *Trueperellapyogenes* y *Escherichiacoli* los cuales causan frecuentemente endometritis y problemas reproductivos posteriores.

Podemos considerar que en nuestro trabajo la cantidad de *E. coli* sobrepasa a la cantidad reportada por otros autores, y esto puede ser debido a las condiciones higiénicas del establo, las cuales no son la ideales.

Los resultados de este estudio sientan las bases para futuras investigaciones sobre patógenos potenciales que pudieran causar procesos infecciosos en las vaquillas, además para la comparación con la presencia de microorganismos en vacas en etapa reproductiva con problemas de fertilidad.

RECOMENDACIONES

Es imperativo continuar estos estudios con el objeto de conocer la presencia de flora anaerobia, además de agentes micóticos presentes en la vagina de vaquillas vírgenes.

Se recomienda implementar estudios con el objetivo de identificar la microflora bacteriana, utilizando métodos como el PCR (reacción en cadena de la polimerasa) ya que es más sensible y específico para la identificación y determinación de las bacterias.

Sería recomendable un seguimiento a aquellas vaquillas que hubiesen tenido microflora bacteriana patógena para un tratamiento oportuno y disminuir la carga bacteriana antes de realizar una inseminación.

Para evitar un aumento progresivo de bacterias patógenas que puedan causar problemas reproductivos y lleguen a afectar la economía del hato, es recomendable tener en cuenta la bioseguridad en las ganaderías en todas sus actividades (inseminación, alimentación, entre otros).

LITERATURA CITADA

1. Alba Gómez., L. O., E. A. Silveira Prado. (2006). La leucorrea vaginal bovina de carácter no inflamatorio y su significación clínica. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET. 7 (10): 1-29.
2. Araujo Guerra, A. (2004). Pubertad en la Hembra Bovina. (En línea). Revista digital VET-UY Agro y Veterinaria. (Uruguay) n.053 http://www.veterinaria.org/asociaciones/vet-uy/articulos/artic_bov/053/bov053.htm. [Consultado el 12 julio 2012].
3. Ata., A., H. Turutoglu, M. Kale, M. S. Gulay y F. Pehlivanoglu. (2010). Microbial Flora of Normal and Abnormal Cervical Mucous Discharge Associated with Reproductive Performance of Cows and Heifers in Estrus. J.Anim.Sci. 23(8):1007-1012.
4. Bastidas Mendoza., P. S. (1999). Pubertad en novillas y toros brahmán. Revista de la Facultad de Agronomía-Universidad del Zulia. 16(6):690-707.
5. BoscanOcando., J., S. Zambrano Nava., J. Nava, y G. Portillo Martínez. (2010). Perfil de la flora bacteriana vaginal: Un riesgo potencial para la reproducción de vacas criollo limonero. Revista Científica (Maracaibo). 20(3):227-234.
6. Fernández Martínez., A., E. A. Silveira Prado y O. F. LópezRojas. (2006). Las infecciones uterinas en la hembra bovina. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET. 7(10):1-38.
7. Gani., M. O., M. M. Amin, M. G. S. Alam, M. E. H. Kayesh, M. R. Karim, M. A. Samad y M. R. Islam. (2008). Bacterial flora associated with repeat breeding and uterine infections in dairy cows. Rev. Bangl. J. Vet. Med. 6(1): 79-86.

8. González T., M., R. Ríos R. y S. MattarV. (2007). Prevalencia de bacterias asociadas a la infertilidad infecciosa en bovinos de Montería, Colombia. *Rev.MVZ Cordoba*. 12(2):1028-1035.
9. Hoving, E. (2009) "Abortions in Dairy Cattle – I Common Causes of Abortions".(En línea): http://pubs.ext.vt.edu/404/404-288/404-288_pdf.pdf [Consultado el 7 de Agosto de 2013].
10. Mac Faddin, J. F. (1980). Biochemical tests for identification of medical bacteria. Editorial Williams &Wilkins, Segunda edición. Estados Unidos de América. 527 p.
11. Montiel Urdaneta, N. S. (1993). Edad y peso a la pubertad en novillas criollo limonero. *Revista Científica, FCV-LUZ*. 3(1): 5-13
12. Otero., C., L. Saavedra, C. Silvia de Ruiz, O. Wilde, A. R. Holfado y M. E. Nader-Macías. (2000). "Vaginal bacterial microflora modifications during the growth of healthy cows". *Letters in Applied Microbiology*. 31(3): 251-254.
13. Panangala., V. S., N. A. Fish y D. A. Bamun. (1978). Microflora of the Cervico-Vaginal Mucus of Repeat Breeder Cows. *La RevistaVeterianriaCanadiense*. 19(4): 83-89.
14. Resende., D., E. Santo, C. Macedo y J. M. Marin. (2007). Prevalence of virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from the genital tract of healthy cows. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*,59(3): 564-568.

15. Rivera M., H. (2009). Revisión anatómica del aparato reproductor de las vacas. Accelerated Genetics; Traducido por Gustavo Peña "*The Dairy Cattle Reproduction Council does not support one product over another and any mention herein is meant as an example not an endorsement*". (En línea) DairyCattleReproductionConference 103. 0pp. 103-110.
<http://www.dcrcouncil.org/media/Public/Rivera%20DCRCH%202009.pdf>.
[Consultado el 30 agosto 2013].
16. Rocha., A. A., M. L. Gambarini, M. A. Andrade, B. D. de Oliveira Filho y E. F. Araújo Gomes. (2004). Microbiota cervico-vaginal durante o final de gestacao e puerperio em vacas girolando. Ciên. Anim. Bras. 5(4): 215-220.
17. Roppel., M. K. y C. M. Campero. (1998). Acción de *Actinomyces pyogenes* en el tracto reproductivo bovino. Revista Therios. 27: 14-20
18. Sorum., H. y M. Sunde. (2001). Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. J. Vet. Res. 32(3-4): 227-241.
19. Sánchez L., M., C. González C., R. Castañeda S., A. Pulido V., H. Guáqueta, M. Aranda S. y M. Rueda V. (2011). Evaluación citológica y microbiológica de lavados uterinos en bovinos con problemas reproductivos. Rev. MVZ Córdoba. 16(3): 2711-2720.
20. Wang., Y., B. N. Ametaj, D. J. Ambrose y G. G. Michael. (2013). Characterisation of the bacterial microbiota of the vagina of dairy cows and isolation of pediocin-producing *Pediococcus acidilactici*. BMC Microbiology . 13(19).

21. Warnick, A. C. y Hansen, P. J. (2010). "Comparison of ovulation, fertilization and embryonic survival in low-fertility beef cows compared to fertile females." Theriogenology. 73(9): 1306-1310.
22. Yasiin, A. F., H. Hupfer, C. Siering y P. Schumann. (2011). Comparative chemotaxonomic and phylogenetic studies on the genus *Arcanobacterium* Collins *et al.* 1982 emend. Lehnen *et al.* 2006: proposal for *Trueperellagen. nov.* and emended description of the genus *Arcanobacterium*. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* 61(6):1265-1274.