



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
HIDALGO**

**INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ÁREA ACADÉMICA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**EVALUACIÓN BACTERIOLÓGICA EN ÚTEROS DE VACAS SACRIFICADAS
EN EL RASTRO MUNICIPAL DE TULANCINGO, HIDALGO**

DIANA CRISTINA ESPINOZA SANTILLAN

TESIS

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

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

Director:

Dr. Blas Rogelio Avila Castillo

Tulancingo de Bravo, Estado de Hidalgo.

2015



AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermanos por el apoyo que me brindaron durante toda mi carrera académica, ya que gracias a ellos veo este logro.

Al programa de mejoramiento del profesorado (PROMEP) de la Secretaría de Educación Pública (SEP), por el financiamiento de la investigación que lleva el número de folio: UAEH-PTC-517 y la beca otorgada al tesista.

Al instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, por ser un pilar en la formación profesional al darme la oportunidad de poseer los conocimientos para desempeñarme profesionalmente.

A mi asesor de tesis el Dr. Blas Rogelio Avila Castillo, por darme la oportunidad de realizar este trabajo, le agradezco infinitamente por el apoyo, consejos, paciencia y amistad brindados.

A los doctores J. Jesús Germán Peralta Ortiz, Pedro Molina Mendoza, Víctor Manuel Martínez Juárez, Fabián Ricardo Gómez de Anda, al médico Erick de Jesús Quintero Sánchez y al M.C José Ignacio Olave Leyva por la revisión de esta tesis.

Mi eterno agradecimiento a los catedráticos que contribuyeron en mi formación profesional, por sus consejos, conocimientos y apoyo.

A la MVZ Dafne Alarcón Gómez por el apoyo brindado en gran parte del proceso y desarrollo de este trabajo y sobre todo por su amistad.

Finalmente a todos mis amigos y compañeros por ser parte de este proceso.

DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico a Dios, por darme la oportunidad de vivir y permitirme llegar hasta este punto, dándome salud para lograr mis objetivos, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

A mis padres Socorro y Odilón por darme la vida y ser el pilar fundamental en todo lo que soy, por su apoyo, consejos, comprensión, amor, ayuda en los momentos difíciles, y por ayudarme con los recursos necesarios para estudiar. Me han dado todo lo que soy como persona, valores, principios, carácter, empeño, perseverancia y el coraje para conseguir mis objetivos.

A mis hermanos Ariel y Erick por estar siempre presentes conmigo y apoyarme en los buenos y malos momentos, los quiero mucho.

A mi abuelo Fernando, mis tías Esperanza, Nestora y Petra, a mis primas Alma Meriel, Magaly y Teresa por darme su apoyo incondicional, sus ánimos, sus consejos y sus regaños.

A mis amigos Abel, Dafne y Saide y a todos mis compañeros de grupo y de la universidad con quienes tuve la oportunidad de compartir conocimientos, alegrías y tristezas y a todas a aquellas personas que durante todo este tiempo han estado apoyándome con su amistad y hermandad al colaborar directa e indirectamente en este trabajo.

¡A todos ellos gracias por el apoyo!

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE CUADROS	VII
RESUMEN	VIII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Microbiota normal del cuerpo de los animales	4
2.2 Origen de la microbiota normal	4
2.3 Clasificación de la microbiota normal en el cuerpo de los animales.....	4
2.3.1 Microbiota residente	5
2.3.2 Microbiota transitoria	5
2.4 Microbiota normal del útero en vacas.....	6
2.4.1 Microbiota en vacas clínicamente sanas	6
2.4.2 Microbiota presente en el tracto reproductor de vacas en periodo de gestación y puerperio	8
2.4.3 Microbiota presente en el tracto reproductor en vacas infértiles	10
2.4.4 Microbiota presente en vacas con infecciones uterinas	12
2.5 Vías de establecimiento de infección uterina	14
2.5.1 Vía ascendente	14
2.5.2 Vía hematógica	14
2.5.3 Vía descendente	15
2.6 Factores de riesgo asociados a la infección uterina	15
2.6.1 Manejo y medio ambiente	15
2.6.2 Condiciones alrededor del parto.....	16
2.6.3 Condiciones uterinas.....	16

2.7 Infección uterina	18
2.7.1 Endometritis	19
2.7.1.1 Endometritis clínica	19
2.7.2 Metritis (Perimetritis).....	19
2.7.2.1 Metritis puerperal.....	20
2.7.2.2 Metritis clínica.....	20
2.7.3 Piometra	20
2.8 Impacto de las infecciones en la reproducción y producción de vacas	21
2.9 Causas de eliminación en vacas	21
III.- HIPÓTESIS	24
IV.- OBJETIVOS	24
4.1 Objetivo general	24
4.2 Objetivos específicos	24
V.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	25
5.1 Lugar de estudio.....	25
5.2 Obtención y procesamiento de las muestras a partir de lavados uterinos	25
5.3 Obtención del precipitado de la muestra para el cultivo	26
5.4 Aislamiento bacteriano en medio de cultivo sólido	26
5.5 Análisis morfológico y aspecto de las colonias aisladas	27
5.6 Coloración por el método de Gram	27
5.7 Estudios bioquímicos	28
5.7.1 Catalasa	28
5.7.2 Cultivo en Agar Sal y Manitol	28
5.7.3 Prueba de Coagulasa Positiva	28

5.7.4 Pruebas Bioquímicas IMViC (Indol, Rojo de Metilo, Voges Proskauer y Citrato)	29
5.7.4.1 Producción de indol (cultivo en medio SIM)	29
5.7.4.2 Rojo de Metilo y Voges Proskauer	30
5.7.4.3 Agar Citrato	30
5.8 Análisis estadístico	30
VI.- RESULTADOS	31
6.1 Porcentaje de aislamiento en el cultivo de las muestras	31
6.2 Aislamiento de bacterias Gram negativas y Gram positivas.....	31
6.3 Identificación de Bacterias Gram (+)	32
6.4 Identificación de bacterias Gram (-)	33
6.5 Total de bacterias aisladas de útero de vacas sacrificadas en rastro	33
VII.- DISCUSIÓN	35
VIII.- CONCLUSIONES	41
IX.- LITERATURA CITADA	42
X.- ANEXOS.....	49
Anexo 1. Preparación de los medios de cultivo.....	49
Anexo 2. Morfología del crecimiento bacteriano.....	50
Anexo 3. Tinción de Gram.....	50
Anexo 4 Fundamentos e interpretación de resultados de la prueba de catalasa	51
Anexo 5 Interpretación de resultados de las pruebas bioquímicas	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Porcentaje de aislamiento de bacterias Gram (+) y Gram (-).....	31
Figura 2. Resultado de las pruebas de identificación de bacterias Gram positivas.M= Manitol, C= Coagulasa, (+)=positivo y (-)= negativo	32
Figura 3. Porcentaje de aislamiento de enterobacterias. Reaccion positiva (+) y negativa (0) para Indol, rojo de metilo, Voges proskauer y Citrato (IMViC).....	34

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Frecuencia de bacterias aisladas en secreciones cérvico-uterinas de vacas clínicamente sanas en diferentes fases del ciclo estral (%)	7
Cuadro2. Cepas bacterianas aisladas en el cérvix de vacas gestantes.....	9
Cuadro 3. Bacterias aisladas del cérvix y útero de vacas en periodo puerperal	9
Cuadro 4. Bacterias aisladas de secreciones cérvico-uterinas en vacas con repetición de estro.....	11
Cuadro 5. Bacterias aisladas del cérvix uterino en vacas con endometritis	13
Cuadro 6. Principales bacterias aisladas de secreciones cervicales de hembras con antecedentes de problemas de infertilidad	13
Cuadro 7. Criterio de eliminación de vacas por categoría.....	22
Cuadro 8. Bacterias del género <i>Staphylococcus</i> coagulasa negativo que corresponden a los resultados de Manitol (+) y Coagulasa (-),Coagulasa (-). yManitol (-).	33
Cuadro 9. Porcentaje de bacterias aisladas en útero de vacas como resultado de la identificación a partir de pruebas bioquímicas (Coagulasa (+), Manitol e IMViC	34

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la presencia e identificación de microorganismos bacterianos en úteros de hembras bovinas sacrificadas en rastro. Se obtuvieron 32 úteros de hembras bovinas, sacrificadas en el rastro municipal de Tulancingo. Posteriormente, a los úteros les fue inyectado 50 ml de solución salina estéril, se aplicó masaje y finalmente se recuperó la mayor cantidad de líquido posible, las muestras obtenidas fueron depositadas en tubos de 15 ml y se centrifugaron a 3500 x g durante 10 minutos, después fue separado el precipitado y se colocó en tubos nuevos numerados para realizar el cultivo. Los precipitados fueron sembrados en Agar Sangre y Agar McConkey para observar el crecimiento y características morfológicas de las colonias bacterianas; posteriormente se les realizó una tinción de Gram para diferenciar a las bacterias en dos grupos, Gram (+) y Gram (-) y observar su morfología. A las colonias identificadas como Gram (+) se les practicaron las pruebas bioquímicas de Catalasa, Cultivo en Agar sal y Manitol y Coagulasa positiva, mientras que, las identificadas como Gram (-) se les realizaron las pruebas IMViC, respectivamente. De las 32 muestras procesadas hubo aislamiento bacteriano en el 100%, de las cuales 18 (56.25%) correspondieron a *Staphylococcus spp*, Coagulasa Negativos (SCN), 5 (15.62%) a *Salmonella spp*, 4 (12.5%) a *E.coli*, 3 (9.37%), 1 (3.12%) a *Klebsiella spp* y 1 (3.12%) a *Kluyvera ascorbata*, respectivamente. La mayor frecuencia de aislamiento en el presente trabajo fue para *Staphylococcus spp* Coagulasa Negativo presentando la única diferencia significativa ($P < 0.05$) con respecto a los demás grupos aislados. En conclusión se determinó que en el útero de vacas sacrificadas en rastro habitan microorganismos bacterianos que forman parte de la microbiota normal del útero sin embargo, son patógenos oportunistas con la capacidad para provocar una infección uterina con efectos negativos en la fertilidad, motivando a la eliminación de la vaca.

Palabras clave: Bovinos, enfermedades uterinas, *Staphyococcus sp.* coagulasa negativos, *E. coli*.

I. INTRODUCCIÓN

Para el año 2050 la población humana mundial se estima será cercana a 9 mil millones de habitantes, lo que aumentará hasta en un 70% la demanda por alimento (FAO, 2012). Por lo que será necesario aumentar la producción de carne y leche, para alimentar a una población humana que se encuentra en constante crecimiento, trazándose como meta mejorar la eficiencia reproductiva y rendimiento del ganado, para poder hacer frente a la creciente demanda de proteína de origen animal (Cabello *et al.*, 2002).

Las enfermedades de origen infeccioso y no infeccioso tienen un impacto negativo en los sistemas de producción de la ganadería bovina, afectando de forma significativa la eficiencia reproductiva del hato. Dentro de los padecimientos infecciosos se encuentra un grupo de enfermedades que afectan al aparato reproductor causando problemas reproductivos como: retención placentaria, metritis, endometritis, piometra, reabsorciones embrionarias, aborto, anestro, repetición de estro e infertilidad (Rodríguez *et al.*, 2004). Estos problemas influyen significativamente en el retraso del restablecimiento de la actividad ovárica post-parto, aumento en intervalos de parto a primera inseminación y parto-concepción, bajas tasas de concepción, días abiertos prolongados y mayor número de servicios por concepción (Córdova *et al.*, 2005). En programas reproductivos, las fallas en la eficiencia reproductiva generan pérdidas económicas al productor debido a aumento del intervalo entre partos, incremento en el número de días abiertos, pérdida de terneros, baja producción de leche, eliminación de vacas

antes del final de su vida productiva, mantenimiento y alimentación de vacas en periodos de baja productividad, gastos en servicios por concepción, gastos por vacas de reposición y servicios profesionales (Forero, 2004).

Los problemas reproductivos incrementan la tasa de eliminación de vacas que tienen muy pocas posibilidades de tener una gestación más, llegando a representar más del 60% del total del desecho (Lozano, 2002; Escápita, 2014). Muchos patógenos específicos y no específicos del tracto reproductor son responsables de problemas reproductivos. El tracto reproductor de las hembras bovinas posee una microbiota en casi toda su extensión, a excepción del útero, ya que allí por lo general no habitan microorganismos, aunque esto puede variar de acuerdo al estatus inmunológico del animal (Sánchez *et al.*, 2011).

Durante la gestación y el parto, el tracto reproductor no se encuentra totalmente estéril, por lo que se pueden aislar microorganismos oportunistas, que producen inflamación e infección (Fernández *et al.*, 2006). Entre las principales bacterias asociadas a problemas reproductivos se encuentran *Trueperella pyogenes* la cuál es un microorganismo oportunista causante de aborto, endometritis, metritis, piometra, repetición de estros e infertilidad (Palmer, 2007; Azawi, 2008). *Streptococcus sp* se relaciona con problemas reproductivos como cervicitis, metritis, endometritis, aborto y retraso en la involución uterina (Rodríguez, 2002; Fernández *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2011). *Escherichia coli* puede convertirse en un microorganismo oportunista altamente patógeno y de gran importancia en el desarrollo de infecciones uterinas e infertilidad, a pesar de ser parte de la

microbiota normal del tracto reproductor en bovinos (González *et al.*, 2007; Escápita, 2014).

Otros microorganismos como *Campylobacter spp*, *Prevotella melaninogenica*, *Brucella abortus*, *Leptospira spp*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp* e *Histophilus somni*, han sido reportados como causantes de problemas reproductivos, debido a su capacidad para producir reabsorciones embrionarias, metritis, endometritis, abortos, retenciones placentarias e infertilidad (Xolalpa *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2011). Actuando de forma aislada o en sinergismo con otros microorganismos (Sheldon *et al.*, 2004).

El mayor porcentaje de eliminación de ganado bovino se debe a problemas reproductivos (Vitela *et al.*, 2004; Chirinos *et al.*, 2008; Fouzet *et al.*, 2013). Por lo que la temprana y correcta detección del patógeno específico involucrado en las infecciones del tracto reproductor que resultan en problemas reproductivos e infertilidad es esencial para implementar una eficaz y correcta intervención para curar y/o prevenir estos problemas (Njiro *et al.*, 2011).

Por lo anterior el objetivo de la presente investigación fue determinar la presencia e identificación de microorganismos bacterianos en úteros de hembras bovinas sacrificadas en rastro.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Microbiota normal del cuerpo de los animales

El cuerpo de los mamíferos mantiene relativamente estable su pH, temperatura además de un aporte constante de nutrientes, lo que provee un hábitat favorable para una gran variedad de microorganismos adaptados al cuerpo del animal, la cual recibe el nombre de microbiota y comprende bacterias, hongos y protozoos que viven dentro y en la piel de los animales sin producir enfermedad en la cual se incluyen microorganismos saprófitos, patógenos potenciales y oportunistas (Fernández *et al.*, 2006).

2.2 Origen de la microbiota normal

Antes del nacimiento, el feto sano está libre de microorganismos, por lo que su primer encuentro con estos, es en el canal de parto especialmente en la vagina donde adquiere los microorganismos, por contacto superficial y posteriormente tragando o inhalando (Silveira, 2006). La naturaleza de esta microbiota depende de factores tales como la dieta, las condiciones zootécnicas y el medio ambiente de la unidad de producción (Guzmán, 2013).

2.3 Clasificación de la microbiota normal en el cuerpo de los animales

La piel y las mucosas hospedan siempre a una gran variedad de microorganismos, los cuales se clasifican en 2 grupos:

2.3.1 Microbiota residente

Está compuesta de microorganismos que están siempre presentes en una parte del cuerpo del hospedero son heterótrofos y viven en simbiosis entre bacterias y organismos superiores (ejemplo: bacterias digestivas). Son inocuos y pueden ser beneficiosos en su localización normal en el hospedero y en ausencia de anomalías. Sin embargo, pueden producir enfermedades si son introducidos en localizaciones diferentes a la normal (microbiota intestinal, microbiota cutánea, microbiota vaginal, etc.) o si ocurren factores predisponentes para su proliferación pudiéndose considerar como oportunistas (Boscán *et al.*, 2010).

2.3.2 Microbiota transitoria

La microbiota normal transitoria está formada por microorganismos no patógenos o solo potencialmente patógenos, hospedados en la piel o las mucosas durante horas, días o semanas, que provienen del ambiente, no producen enfermedades y no se establecen por sí mismos permanentemente en la superficie (Fernández *et al.*, 2006). Como *E. coli*, *T. pyogenes*, *Staphylococcus sp*, entre otros, los cuales son de poca importancia en tanto que la microbiota residente permanezca sin alterarse, pero si ésta se altera los microorganismos transitorios pueden responder aprovechando la situación, proliferar y llegar a producir enfermedades (Sánchez *et al.*, 2011).

2.4 Microbiota normal del útero en vacas

La clase y número de microorganismos de la microbiota normal uterina varían de acuerdo a distintas circunstancias, como la edad, estado fisiológico (sanas, gestantes, en puerperio, vacas con repetición de servicios o con infecciones clínicas) y las condiciones ambientales presentes en el lugar donde se ubica la unidad de producción (Otero *et al.*, 2000). Las bacterias aisladas del tracto reproductor se clasifican principalmente en 4 grupos: Bacterias Gram positivas (*Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp*, *Lactobacillus spp*, y *Enterococcus*), Gram negativas (*E. coli*, *Klebsiella spp*, *Proteus spp*), ácido alcohol resistentes (*T. pyogenes*) y bacilos esporoformadores (*Clostridium spp*) (Sánchez *et al.*, 2011).

2.4.1 Microbiota en vacas clínicamente sanas

Las especies aisladas en el cérvix y el útero sin producir trastornos pertenecen a la microbiota natural residente o transitoria del aparato reproductor de la hembra (Cuadro 1). Sin embargo, esta flora puede tener un carácter de patógenos oportunistas cuando la resistencia local y general del animal se debilita rompiendo el equilibrio biológico (Fernández *et al.*, 1984).

En un estudio realizado en novillas cebú vírgenes no expuestas a toro se obtuvo un 54.6% de frecuencia de aislamientos bacterianos que correspondieron a *E. coli* y *Klebsiella spp* (González *et al.*, 2007).

Cuadro 1. Frecuencia de bacterias aisladas en secreciones cérvico-uterinas de vacas clínicamente sanas en diferentes fases del ciclo estral (%).

Microorganismos	Cérvix	Útero
<i>E. coli</i>	33.3	5.6
<i>E. coli var. Haemolytica</i>	10.1	8.6
<i>Haffnia sp.</i>	6.4	
<i>Shigella sp.</i>	1.2	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.5	
<i>Staphylococcus albus</i>	23	17.2
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.5	
<i>Staphylococcus citreus</i>	7.6	
<i>Streptococcus viridans</i>	1.2	
<i>Enterococcus faecalis</i>	7.6	1.7
<i>Sarcina lutea</i>	3.8	15.5

Tomado de Fernández *et al.* (1984)

Klebsiella sp se ha clasificado como microbiota uterina normal en novillas (González *et al.*, 2007), que no se asocia con problemas reproductivos, sino que solo se considera como microbiota normal del útero de vacas (Méndez, 2008). Mientras que *E. coli* es una bacteria que coloniza el intestino pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de la microbiota normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos (Escápita, 2014). Este microorganismo se puede aislar unos días después del parto, con altos porcentajes como el 36% reportado por Rodríguez (2002).

Lactobacillus sp también es considerado como microbiota normal de la cavidad oral, mucosa intestinal y vaginal. Este microorganismo crece generando un

beneficio para su hospedero, debido a que la producción de ácido láctico reduce el pH, contribuyendo a la disminución o retraso en el crecimiento de otro tipo de microbiota potencialmente patógena (Sánchez *et al.*, 2011).

T. pyogenes es habitante normal de la mucosa nasal, conjuntival, vaginal y prepucial en los rumiantes, aunque se ha encontrado relacionado con una gran variedad de problemas reproductivos como abortos, infecciones uterinas, metritis endometritis entre otros (Araínga *et al.*, 2003).

2.4.2 Microbiota presente en el tracto reproductor de vacas en periodo de gestación y puerperio

Durante el periodo de gestación y parto, el tracto reproductor no permanece estéril, por lo que el hallazgo de microorganismos saprófitos en estos periodos depende del estado físico e inmune en que se encuentra el animal, de modo que en estas condiciones adecuadas el útero es capaz de tolerar un crecimiento latente de bacterias sin que necesariamente causen daños al feto o a la madre (Cuadro 2 y 3; Fernández *et al.* 2006).

El puerperio es el espacio de tiempo que transcurre entre la expulsión de la placenta y la involución uterina donde existen condiciones óptimas para que muchos gérmenes de la microbiota normal exacerben la virulencia acompañados de otros microorganismos del medio externo y originen un cuadro infeccioso cuando el mecanismo fisiológico de defensa en el ambiente uterino está alterado (Rocha *et al.*, 2004).

Cuadro 2. Cepas bacterianas aisladas en el cérvix de vacas gestantes.

Microorganismos	Número	%
<i>E. coli</i>	27	43.4
<i>Klebsiella aerogenes</i>	4	6.3
<i>Serratia marcescens</i>	2	3.2
<i>P. aeruginosa</i>	1	1.7
<i>S. aureus</i>	1	1.7
<i>S. citreus</i>	13	20.6
<i>S. albus</i>	3	4.7
<i>Micrococcus sp.</i>	3	4.7
<i>Sarcina lutea</i>	6	9.5
<i>Streptococcus viridans</i>	2	3.2
<i>Streptococcus feacalis</i>	1	1.7

Tomado de Fernández *et al.* (2006)**Cuadro 3.** Bacterias aisladas del cérvix y útero de vacas en periodo puerperal

Microorganismos	Cérvix		Útero	
	Número	%	Número	%
<i>E. coli</i>	21	38.6	29	42.6
<i>E. coli var. haemolytica</i>			14	20.6
<i>Klebsiella aerogenes</i>	3	4	1	1.4
<i>Proteus sp</i>	2	3.5		
<i>Haffnia sp</i>	1	1.7	5	7.3
<i>P. aeruginosa</i>			1	1.4
<i>S. albus</i>	9	15.4	11	16.1
<i>S. citreus</i>	2	3.5	2	2.9
<i>Micrococcus sp</i>	7	12.3		
<i>Sarcina lutea</i>	5	8.8		
<i>Streptococcus durans</i>	5	8.8		
<i>Streptococcus viridans</i>			2	2.9
<i>Enterococcus feacalis</i>			4	5.8

Tomado de Fernández *et al.* (2006)

La microbiota presente durante el periodo puerperal temprano, tiene un amplio espectro de contaminantes ambientales tales como, *E. coli*, *T. pyogenes*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus sp*, *Pasteurella multocida* y varias especies anaerobias como *Clostridium sp*, *Bacteroides sp* y *Fusobacterium sp*. Sin embargo, a medida que la involución uterina progresa, la mayoría de esas bacterias son eliminadas, de tal forma que a las 4 semanas los cultivos bacteriológicos son negativos o se reducen considerablemente, mecanismo que le confiere el carácter de microbiota transitoria (González *et al.*, 2007).

2.4.3 Microbiota presente en el tracto reproductor de vacas infértiles

En estudios realizados en vacas infértiles encontraron que el microorganismo con mayor frecuencia de aislamiento fue *T. pyogenes*, seguido de *Streptococcus sp* y *E.coli* (González *et al.*, 1978). Fernández *et al.* (1985), realizaron un estudio de la microbiota de secreciones cérvico-uterinas en vacas con repetición de estro observando una gran diversidad de microorganismos como se observa en el Cuadro 4.

Estos resultados evidencian que la *E. coli* es la bacteria que más se aísla en las secreciones cérvico-uterinas de vacas sanas y con repetición de estro (Fernández *et al.*, 1985). En un estudio realizado por González *et al.* (2007), de un total de 384 muestras cervicales se observó un aislamiento prevalente de *E. coli* (19.6%), bacilos Gram Negativos Oxidantes (*Acinetobacter spp* y *Burkholderia spp*) (17.4%), *Klebsiella spp* (16.4%), *Pseudomonas spp* (15.6%) y *Campylobacter spp*

Cuadro 4. Bacterias aisladas de secreciones cérvico-uterinas en vacas con repetición de estro.

Microorganismos	Cérvix		Útero	
	Número	%	Número	%
<i>E. coli</i>	25	42.3	23	41.8
<i>E. coli var. haemolytica</i>			11	20
<i>Klebsiella aerogenes</i>	1	1.7	1	1.8
<i>Proteus sp</i>	2	3.4		
<i>Haffnia sp</i>	2	3.4	4	7.3
<i>S. albus</i>	10	16.9	3	5.5
<i>S. citreus</i>	2	3.4	2	3.6
<i>Streptococcus viridans</i>	11	18.6	6	10.9
<i>Streptococcus durans</i>	5	8.5		
<i>Sarcina lutea</i>	3	5	1	1.8
<i>Enterococcus faecalis</i>			4	7.3

Tomado de Fernández *et al.* (1985)

(1.8%) en vacas con problemas de infertilidad. Sánchez *et al.* (2011), reportaron que *T. pyogenes* puede alojarse hasta 21 días postparto, generando una severa endometritis, lo que usualmente termina en infertilidad.

La presencia de *T. pyogenes* en las secreciones cérvico-uterinas de vacas con repetición de estro es la principal causa de los procesos inflamatorios crónicos, piometra, metritis puerperal, endometritis así como los abortos embrionarios, lo que significa que juega un papel importante en el origen de la repetición de servicios en vacas y por lo tanto infertilidad (Fernández *et al.*,2006).

2.4.4 Microbiota presente en vacas con infecciones uterinas

Los gérmenes aislados de casos de endometritis bovina constituyen una amplia gama de contaminantes ambientales, pero los más comúnmente asociados con la inflamación del endometrio han sido *T. pyogenes*, *E. coli*, *Streptococcus* α hemolítico y *Mannheimia haemolytica* (Bonnett *et al.*, 1995). *T. pyogenes* ha sido el germen más frecuente aislado (52.8%). Los *Streptococcus sp*, la *E. coli var. haemolytica*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* fueron los gérmenes más importantes que le siguieron en incidencia (Cuadro 5). Por otra parte, González *et al.* (2007), reportaron el aislamiento de las principales bacterias presentes en secreciones cervicales de hembras bovinas con antecedentes de patologías reproductivas asociadas a infertilidad infecciosa como se muestra en el Cuadro 6.

Los patógenos más comunes aislados en cuadros de endometritis clínica han sido *T. pyogenes* y bacterias Gram negativas anaerobias como *Fusobacterium necrophorum*, *Prevotella spp.* y *Bacteroides* (Földi *et al.*, 2006).

Sánchez *et al.* (2011), evaluaron 21 muestras de lavados uterinos de vacas con historia de problemas reproductivos provenientes de hatos lecheros, donde reportaron aislamientos correspondientes a bacterias patógenas causantes de problemas reproductivos como *Streptococcus sp* β hemolítico (33.33%), *Streptococcus sp. α haemolytico* (50%), *T. pyogenes* (16.66%) y en un 9.52% de las muestras se observaron espiroquetas.

Cuadro 5. Bacterias aisladas del cérvix uterino en vacas con endometritis

Microorganismos	%
<i>T. pyogenes</i>	52.8
<i>Streptococcus sp</i>	12.1
<i>E. coli var. Haemolytica</i>	9.8
<i>P. aeruginosa</i>	9.2
<i>Streptococcus pyogenes</i>	6.4
<i>S. aureus</i>	3.6
<i>S. viridans</i>	1.9
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1.8
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	1.2
<i>Streptococcus uberis</i>	0.6
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	0.6

Tomado de Fernández *et al.* (2006)**Cuadro 6.** Principales bacterias aisladas de secreciones cervicales de hembras con antecedentes de problemas de infertilidad

Microorganismo aislado	Animales problema
<i>E. coli</i>	55 (19.6%)
<i>Acinetobacter spp, Burkholdelia spp</i>	49 (17.4%)
<i>Klebsiella spp.</i>	46 (16.4%)
<i>Pseudomonas spp.</i>	44 (15.6%)
<i>Enterobacter spp, S. aureus</i>	30 (10.7%)
Sin aislamiento	11 (3.9%)
<i>Campylobacter spp.</i>	5 (1.8%)
Otros	32 (11.4%)

Modificado de González *et al.* (2007)

Entre las bacterias anaerobias aisladas en el útero de vacas con infección uterina se encuentran *T. pyogenes*, *Porphyromonas melaninogenicus*, *Bacterioides (fragilis, levii, oralis y melaninogenicus)* y *Clostridium (perfringes y sporogenes)*, *Streptococcus* (α hemolítico y *pyogenes*); *Staphylococcus (aureus y epidermidis)*, *E.coli* (no *haemolytica* y β *haemolytica*), *Lactobacillus sp*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *P. haemolytica* y *enterobacterias sp* y en algunos casos se pueden aislar *Mycoplasma sp*, *Clamydophila sp*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Mucor sp*, *Tritrichomonas foetus* y los virus de rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) y diarrea viral bovina (BVD) (Fernández *et al.*, 2006).

2.5 Vías de establecimiento de infección Uterina

2.5.1 Vía ascendente

Las infecciones uterinas usualmente se producen por vía ascendente. Durante el parto, las barreras físicas normales a la contaminación (vagina, vestíbulo vaginal y cérvix) están severamente comprometidas y luego del parto hay un gran cantidad de tejido necrótico y fluidos creando un ambiente ideal para proliferación bacteriana (Palmer, 2007). Los microorganismos pueden entrar por la vagina, desde donde ascienden hacia el útero o pueden ser depositados en el útero durante la cópula o la inseminación artificial (Fernández *et al.*, 2006).

2.5.2 Vía hematógena

Adquiere mayor importancia hacia el final de la gestación. El microorganismo infectante puede entrar al organismo materno a través del aparato digestivo

(*Brucella abortus*, *Salmonella*, *Leptospira*, *Listeria*), o de la mucosa nasal o conjuntival (rinotraqueitis infecciosa bovina, leptospirosis, parainfluenza, diarrea viral bovina); en todo caso siempre existe una bacteremia o viremia materna antes de que se produzca la invasión del útero, desde el cual el microorganismo infectante puede invadir la placenta y luego pasar al feto (Catena *et al.*, 1999).

2.5.3 Vía descendente

Es la ruta más rara y consiste en el descenso de una infección desde los oviductos hacia el útero, puede ocurrir en casos de peritonitis (Fernández *et al.*, 2006).

2.6 Factores de riesgo asociados a la infección uterina

Los microorganismos no específicos capaces de causar fallas en la fertilidad, generalmente requieren de la intervención de factores predisponentes para su establecimiento y desarrollo en el útero de los animales domésticos. Existe un grupo de factores que predisponen a la contaminación del útero con diferentes agentes microbianos (Recce *et al.*, 2014).

2.6.1 Manejo y medio ambiente

Incluye los factores relacionados con el estrés, la alta producción y las enfermedades metabólicas y carenciales. Los microorganismos habituales de la vagina llegan a ser patógenos cuando los animales han comprometido su sistema inmune, debido a la tensión causada por varios factores tales como cambios bruscos de temperatura, malnutrición, la gestación y el parto (Rocha *et al.*, 2004).

Si las vacas son sometidas a condiciones de estrés o insuficiencia alimentaria, su resistencia general y defensas inmunológicas se debilitan y la microbiota oportunista puede pasar inadvertida y desarrollarse la infección (Escápita, 2014). Algunas condiciones metabólicas tales como la fiebre de la leche y la cetosis también han sido asociadas a estos problemas (Sheldon *et al.*, 2004).

2.6.2 Condiciones alrededor del parto

Tiene en consideración la higiene, distocias, traumatismos y la poca relajación del canal del parto, ya que durante este proceso, el feto es expulsado y el tracto genital se expone al medio y las bacterias, que normalmente habitan la parte posterior de dicha región y el área perineal, penetran fácilmente y pueden infectar el útero (Recce *et al.*, 2014). Las condiciones son muy favorables para las bacterias, la fisiología normal y el mecanismo anatómico de cierre del tracto genital resultan temporalmente insuficientes, sobre todo si el mecanismo de defensa del útero está debilitado; además, si el parto se prolonga o si es necesario prestarle asistencia, el grado de contaminación bacteriana puede incrementarse (Meléndez *et al.*, 2010). Intervenciones como la inseminación artificial, la monta y los exámenes obstétricos, también pueden incrementar el riesgo de introducción de bacterias en el útero (García *et al.*, 2004)

2.6.3 Condiciones uterinas

La disminución de la inmunidad local, el tono uterino, la capacidad fagocitaria de los leucocitos y la aparición del primer estro posparto son condiciones uterinas a considerar. Los cambios en el pH pueden afectar la microbiota vaginal y

predisponer a la infección del aparato reproductor, se ha observado que el pH de la vagina de la vaca sana oscila entre valores de 6.92 ± 0.51 (Alba y Silveira, 2006).

Los trastornos hormonales pueden predisponer al establecimiento de los microorganismos en el útero de los animales domésticos y tienen un efecto definido sobre la resistencia del útero contra la infección bacteriana. Las altas concentraciones de estrógenos estimulan la fagocitosis dentro del útero, las cuales se dan en la fase folicular, previa a la ovulación, mientras que la progesterona reduce la actividad fagocitaria (Pérez, 1996; Leblanc *et al.*, 2004). La retención de las membranas fetales es causa de contaminación bacteriana y retraso en la involución uterina relacionada con altos valores de progesterona y bajos niveles de estradiol (García *et al.*, 2004).

La exposición a agentes antimicrobianos puede favorecer las infecciones por bacterias patógenas resistentes. La vía de administración y las características farmacocinéticas de la droga, son factores que condicionan el cambio de la microbiota normal del tracto reproductor, razón por la cual debe haber un diagnóstico correcto para aplicar un tratamiento que cumpla con la función de recuperar la salud del animal sin afectar gravemente el estado de la microbiota normal (Gómez *et al.*, 2006).

Los abortos e inducciones de partos, son otras de las causas de endometritis como complicación al provocar inmadurez en el desarrollo de las membranas

fetales y trastornos en su eliminación, dando como resultado su retención (García, 2004).

2.7 Infección Uterina

Alrededor del 95% de las vacas desarrollan una infección uterina durante los primeros días postparto, debido a que el útero postparto es un buen ambiente para el crecimiento bacteriano, ya que es templado, lleno de líquido y contiene una cantidad variable de tejidos necróticos (Hernández, 2012). Las bacterias más frecuentemente encontradas en los procesos inflamatorios del útero son *T. pyogenes*, *Fusobacterium necrophorum* y *E.coli* (Palmer, 2007).

El desarrollo de la enfermedad depende del estado inmunológico de la vaca, las especies bacterianas y la carga de contaminación de la cavidad uterina (Sheldon *et al.*, 2004). A través de leucotoxinas, inhibidores de la fagocitosis y varios promotores del crecimiento, estas bacterias aumentan el crecimiento de unas con otras generando la infección causando inflamación del útero (Azawi, 2008). Sin embargo, la mayoría de las vacas eliminan las infecciones mediante sus mecanismos de defensa, su buen estado de salud y la involución rápida del útero (Azawi, 2008).

2.7.1 Endometritis

Es la inflamación superficial (mucosa uterina), que no se extiende más allá del estrato esponjoso y los tejidos glandulares subyacentes, la cual desaparece conforme avanza la involución uterina (Sheldon *et al.*, 2004),

2.7.1.1 Endometritis clínica

Cuando los mecanismos de defensa no logran eliminar la infección y ésta persiste más allá de los 21 días postparto se desencadena un retraso en la involución uterina y existe eliminación de exudado purulento o mucopurulento por la vagina. Puede desarrollarse sin presentar ninguna afectación en el estado general, por lo que su diagnóstico antes de los 21 días es difícil (Gilbert *et al.*, 2005).

Las principales consecuencias de la endometritis son la infertilidad al tiempo de la infección, la subfertilidad que se produce aún después de resuelta la enfermedad y el alargamiento del intervalo entre partos (Herath *et al.*, 2006). Se calcula que en vacas con endometritis la tasa de concepción es aproximadamente 20% inferior y que el intervalo entre partos es 30 días mayor, dando como resultado un aumento del 3% en los animales desechados por falla reproductiva (Leblanc *et al.*, 2002; Sheldon *et al.*, 2004). Los factores de riesgo identificados son la retención placentaria y la metritis (Hernández, 2012).

2.7.2 Metritis (Perimetritis)

Es el proceso inflamatorio que afecta todas las capas del útero: endometrio, submucosa, muscular y serosa (BonDurant, 1999).

2.7.2.1 Metritis puerperal

En la metritis puerperal la vaca presenta el útero agrandado, con descarga uterina acuosa, fétida y de color marrón rojizo, asociada con signos de enfermedad sistémica (disminución de la producción, toxemia, depresión, fiebre > 39.5°C) dentro de los 21 días postparto (Sheldon *et al.*, 2004). Generalmente está asociada a la retención placentaria (Fernández *et al.*, 2006). Esta infección es la única capaz de poner en riesgo la vida del animal y frecuentemente requiere de tratamientos sistémicos ya que las endotoxinas y los patógenos pueden salir del útero hacia la circulación, cuando la mucosa está severamente debilitada (Meléndez *et al.*, 2010).

2.7.2.2 Metritis clínica

Por su parte la metritis clínica es el proceso inflamatorio que involucra las diferentes capas del útero (mucosa, muscular y serosa), que se presenta en los primeros 21 días postparto y se caracteriza por un retraso en la involución uterina y secreciones purulentas, y no hay signos de enfermedad sistémica (Sheldon *et al.*, 2004).

2.7.3 Piometra

Es una patología que se desarrolla en las vacas que ovulan en los primeros 20 días postparto y que al mismo tiempo padecen una infección uterina; por lo que bajo estas condiciones, la progesterona favorece la proliferación de exudado purulento dentro del lumen uterino (Hernández, 2012). Los cambios ocasionados

en el endometrio alteran la secreción de PGF2 α , lo que resulta en un cuerpo lúteo activo y en anestro (Bell *et al.*, 2007). Debido a la presencia de progesterona luteal el cérvix se encuentra cerrado, aunque en algunos casos el lumen no está ocluido completamente y se puede observar descarga purulenta en la vagina (Sheldon *et al.*, 2004). La mayoría de las veces, la piometra se presenta como secuela de la endometritis (Földi *et al.*, 2006).

Después de la resolución del problema, las vacas tardan en quedar gestantes, lo cual está directamente relacionado con la degeneración endometrial que incrementa la tasa de pérdidas embrionarias y fetales (Sheldon *et al.*, 2004).

2.8 Impacto de las infecciones uterinas en la reproducción y producción de vacas

Las infecciones uterinas (metritis y endometritis) alargan el periodo del parto a la concepción, aumentan del periodo del parto a la primera ovulación, disminuyen el porcentaje de concepción al primer servicio, aumenta el porcentaje de desechos, disminuye la tasa de vacas inseminadas y disminuye la producción (LeBlanc *et al.*, 2002; García *et al.*, 2004).

2.9 Causas de eliminación en vacas

La eliminación de animales del hato se da por razones voluntarias (mejora genética o manejo) e involuntarias (enfermedad o fallas reproductivas; Vitela *et al.*, 2004). Si las causas de eliminación son voluntarias, el productor es libre de tomar las medidas necesarias para maximizar su beneficio (Fetrow *et al.*, 2006). Mientras

que el desecho involuntario es de gran importancia cuando se presenta de forma prematura ya que puede provocar un efecto negativo en la producción (Herath *et al.*, 2006). Las principales causas de eliminación se agrupan en 8 categorías (Cuadro 7).

Cuadro 7. Criterio de eliminación de vacas por categoría

Muerte:	Vaca encontrada muerta en la explotación
Sacrificio urgente:	Fracturas, luxaciones, postración, toxemia, peritonitis, endocarditis o septicemias.
Improductividad:	Baja producción
Problemas de ubre:	Mastitis, pérdida de cuartos o ubre descolgada
Problemas reproductivos:	Abortos, metritis, infertilidad, infecciones del aparato reproductor, etc.
Enfermedades infecciosas:	Brucella, Tuberculosis, enfermedades respiratorias, cardíacas y digestivas.
Problemas pódales:	Cojeras, pezuñas deformes, Infecciones en la pezuña, etc.
Otras:	Edad, Características morfológicas, Económicas, etc.

Modificado de: Vitela *et al.*, 2004; Chirinos, 2008; Fouz *et al.*, 2013.

Entre las diferentes causas de eliminación de vacas, la principal es la debida a problemas de tipo reproductivo, esto de acuerdo a los diferentes estudios que se han realizado (Vitela *et al.*, 2004; Chirinos, 2008; Bell *et al.*, 2010; Pinedo *et al.*, 2010).

Establecer el diagnóstico de la causa de las enfermedades y problemas reproductivos suele ser complicado ya que las principales enfermedades que afectan a la reproducción se clasifican según su origen, el cual puede ser infeccioso y no infeccioso (Rivera *et al.*, 2000). Las enfermedades infecciosas

incluyen a bacterias (Brucelosis, Campylobacteriosis, Listeriosis, Leptospirosis, Salmonelosis entre otras), virus (Rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) y Diarrea viral bovina (DVB), Parásitos (Tricomoniasis y Neosporosis) y Hongos (Aspergilosis). Mientras que las no infecciosas incluyen desordenes hormonales, causas toxicas, físicas y genéticas (Puente, 2002).

Tomando en cuenta la gran variedad de agentes que afectan la eficiencia reproductiva de los bovinos y la similitud en algunos signos clínicos, como abortos, reabsorciones, metritis, endometritis e infertilidad; cabe la posibilidad de que microorganismos emergentes con potencial patógenos, se enmascaren con otras causas de problemas reproductivos, revelando la posible existencia de un subdiagnóstico (Piedrahita *et al.*, 2010) en las enfermedades que propician el desecho de las vacas del hato (Hernández *et al.*, 2012).

III. HIPÓTESIS

Las vacas enviadas a rastro tienen un alto porcentaje de microorganismos bacterianos intrauterinos potencialmente patógenos y responsables de procesos inflamatorios con efectos negativos en la fertilidad.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar la presencia de microorganismos bacterianos en úteros de hembras bovinas sacrificadas en rastro.

4.2 Objetivos específicos

- 1.-Determinar la presencia e identificación de microorganismos bacterianos en úteros de vacas de rastro.
- 2.-Analizar la relación de los microorganismos bacterianos como posible causa de infección en útero de vacas de desecho.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Lugar de estudio

El presente estudio se realizó en el laboratorio de Anatomía y Necropsias y el laboratorio de Investigación de Bacteriología, del Área Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, en el Instituto de Ciencias Agropecuarias (ICAp), de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. El instituto se localiza en, Tulancingo en el Estado de Hidalgo, ubicado a una altitud sobre el nivel del mar entre 2200 a 2400, a una latitud de 20°04'53' Norte y 98°22'07" Oeste (INAFED, 2011).

5.2 Obtención y procesamiento de las muestras a partir de lavados uterinos

Se obtuvieron 32 úteros de hembras bovinas sacrificadas en el rastro municipal de Tulancingo, ubicado en Av. Laureles S/N, Colonia La Morena, Tulancingo, Hidalgo, en un periodo comprendido entre los meses de abril y noviembre del 2014. Los úteros se obtuvieron los días viernes, días que el rastro dedicaba al sacrificio de las hembras. El origen de los animales y la causa de su sacrificio fue desconocida. Las muestras se transportaron dentro de bolsas de plástico en forma individual y una hielera a temperatura ambiente entre 15 y 25°C hasta el laboratorio de Anatomía y Necropsias.

Posteriormente, se realizó la desinfección externa del cuerpo del útero con cloruro de benzalconio y se introdujeron 50 ml de solución salina estéril en el lumen uterino, mediante una aguja hipodérmica conectada a una jeringa de 10 ml, se

aplicó masaje y finalmente se extrajo la mayor cantidad de líquido que fue colocado en tubos (Falcón®) de 15 mL que se etiquetaron y almacenaron en refrigeración a 4°C hasta su procesamiento y análisis en el laboratorio de Bacteriología (Sánchez *et al.*, 2011).

5.3 Obtención del precipitado de la muestra para el cultivo

Los tubos con el fluido recuperado fueron centrifugados a 3,500 × g durante 10 minutos, posteriormente se separó el precipitado (componentes celulares de mayor tamaño y densidad) de la muestra y se colocó en tubos nuevos numerados para realizar el cultivo (Vadillo *et al.*, 2002).

5.4 Aislamiento bacteriano en medio de cultivo sólido

El precipitado de las muestras fue sembrado en medios de cultivo Agar Sangre Agar McConkey (**Anexo 1**), por medio de la diseminación en placa, se colocaron unas gotas del precipitado de la muestra en un punto periférico de la placa para trazar con el asa estrías apretadas de poca extensión, se quemó y enfrió en asa y se giró la placa en sentido contrario a las manecillas del reloj arrastrando el material de la estría primaria para formar 2 estrías más completando la diseminación (Stanchy *et al* 2007). Posteriormente se incubaron (Incubadora de CO₂, THERMO®) a 37°C durante 48 horas dentro de una jarra de anaerobiosis (Mc Intosh) de vidrio proporcionando un medio de oxigenación del 3% y una condición de microaerófilia. Con el objetivo de obtener cultivos puros de bacterias se realizaron 2 cultivos más en los mismos medios de cultivo (Agar sangre y Agar McConkey), a cada una de las muestras tomando para el segundo cultivo una

muestra del primer cultivo y para el tercer cultivo una muestra del segundo cultivo respectivamente para llegar a un mejor aislamiento del microorganismo; así mismo a cada uno se le realizó una tinción de Gram para poder identificar con mayor precisión la morfología, tamaño y agrupación de la colonia y poder dar seguimiento a la identificación por medio de pruebas complementarias.

5.5 Análisis morfológico y aspecto de las colonias aisladas

Después del periodo de incubación cada cultivo realizado fue analizado para observar el crecimiento de colonias bacterianas; así como sus características morfológicas de pigmentación, forma, dimensiones, elevación, contorno y superficie (**Anexo 2**).

5.6 Coloración por el método de Gram

Se realizó la coloración de Gram, utilizando la técnica convencional propuesta por Stanchi (2007; **Anexo 3**) a los cultivos con crecimiento, para clasificar a las bacterias como: Gram (+) o Gram (-) de acuerdo a la composición de su pared celular. También se observó la morfología (cocos, bacilos, vibriones o espirilos), el tamaño y la agrupación de cada colonia, utilizando un microscopio óptico con el objetivo de observación en inmersión (100x).

5.7 Estudios bioquímicos

5.7.1 Catalasa

Se utilizó esta prueba para diferenciar entre el género *Staphylococcus* (catalasa positivo) del género *Streptococcus* (catalasa negativo) de las bacterias identificadas como Gram (+) (**Anexo 4**). Se colocó una muestra de la bacteria aislada utilizando un asa bacteriológica en un porta objetos y posteriormente se agregaron unas gotas de peróxido de hidrógeno al 30% usando una pipeta Pasteur y se observó la producción o no de burbujas (Stanchy *et al* 2007).

5.7.2 Cultivo en Agar Sal y Manitol

Se utilizó este medio selectivo y diferencial para el aislamiento y diferenciación de estafilococos a partir de las muestras con aislamiento de cocos Gram (+) en los resultados de la tinción de Gram. La siembra se hizo en mediante el método convencional de estrías (Stanchy *et al* 2007) y se dejó incubando durante 18 a 24 horas (Incubadora de CO₂, THERMO®) a 37°C en aerobiosis. Después del periodo de incubación los cultivos fueron revisados para observar los resultados (**Anexo5**).

5.7.3 Prueba de Coagulasa Positiva

Esta prueba se realizó para poder diferenciar los distintos tipos de microorganismos del género *Staphylococcus*, de modo que sólo se realizó a los cultivos que tenían crecimiento de colonias con morfología de cocos Gram (+). Para su realización se utilizó plasma de cordero y plasma de conejo, donde se

mezcló una asa de siembra cargada con el microorganismo obtenido de un medio de cultivo sólido con 0.5 ml de suero de plasma de conejo o cordero en un tubo pequeño, el cual se dejó incubar (Incubadora de CO₂, THERMO®) a 37°C durante 24 horas. Los tubos eran revisados cada 30 minutos para observar la formación de un coagulo realizando la primera observación a las 2 horas del inicio de la incubación (**Anexo 5**).

5.7.4 Pruebas Bioquímicas IMViC (Indol, Rojo de Metilo, Voges Proskauer y Citrato)

A los cultivos identificados como bacilos Gram (-), que crecieron en agar McConkey, de acuerdo con la tinción de Gram se les realizaron las pruebas IMViC, para la identificación primaria de especies de la familia *Enterobacteriaceae*.

5.7.4.1 Producción de indol (cultivo en medio SIM)

Esta prueba tiene la finalidad de verificar la movilidad, producción de indol y de sulfuro de hidrogeno por los microorganismos. Se realizó la siembra por punción profunda utilizando un asa de inoculación recta abarcando 2 tercios de la profundidad del medio de cultivo desde la superficie. Posteriormente se incubo (Incubadora de CO₂, THERMO®) a 37°C, durante 48 horas en un ambiente de aerobiosis (**Anexo5**).

5.7.4.2 Rojo de Metilo y Voges Proskauer

Se realizó para determinar la capacidad de un microorganismo de fermentar la glucosa con producción de ácido por la vía ácido mixta o con producción de un producto final neutro (acetoína) por la vía butanodiólica. Se inoculó el medio de cultivo transfiriendo con un asa de platino una pequeña muestra del cultivo puro y posteriormente se dejó incubar (Incubadora de CO₂, THERMO®) a 37°C durante 48 horas (**Anexo5**).

5.7.4.3 Agar Citrato

Es un medio utilizado en la diferenciación de enterobacterias en base a la capacidad de usar citrato como única fuente de carbono y energía. La siembra se hizo mediante el trazado de estrías en la superficie del medio de cultivo, para después incubar en aerobiosis (Incubadora de CO₂, THERMO®) a 37°C durante 48horas (**Anexo5**).

El resultado de esta prueba se expresó mediante símbolos de positivo o negativo (+ ó-) según el resultado de cada prueba, siguiendo siempre el orden establecido por las iniciales del método (Indol, Rojo de metilo, Voges Proskauer y Citrato)

5.8 Análisis estadístico

Las frecuencias obtenidas de los cultivos anteriormente mencionados fueron analizadas con el PROCREQ (SAS, 1982) realizado la prueba de χ^2 a un nivel de significancia de 0.05.

VI.RESULTADOS

6.1 Porcentaje de aislamiento en el cultivo de las muestras

De las 32 muestras procesadas, el 100% resulto positivo al aislamiento bacteriano.

6.2 Aislamiento de bacterias Gram negativas y Gram positivas

La tinción de Gram mostró que 14 de las 32 muestras (43.75%) correspondieron a bacilos Gram (-) y 18 muestras (56.25%) a cocos Gram (+), sin diferencias entre grupos ($P>0.05$) como se muestra en la figura 1.

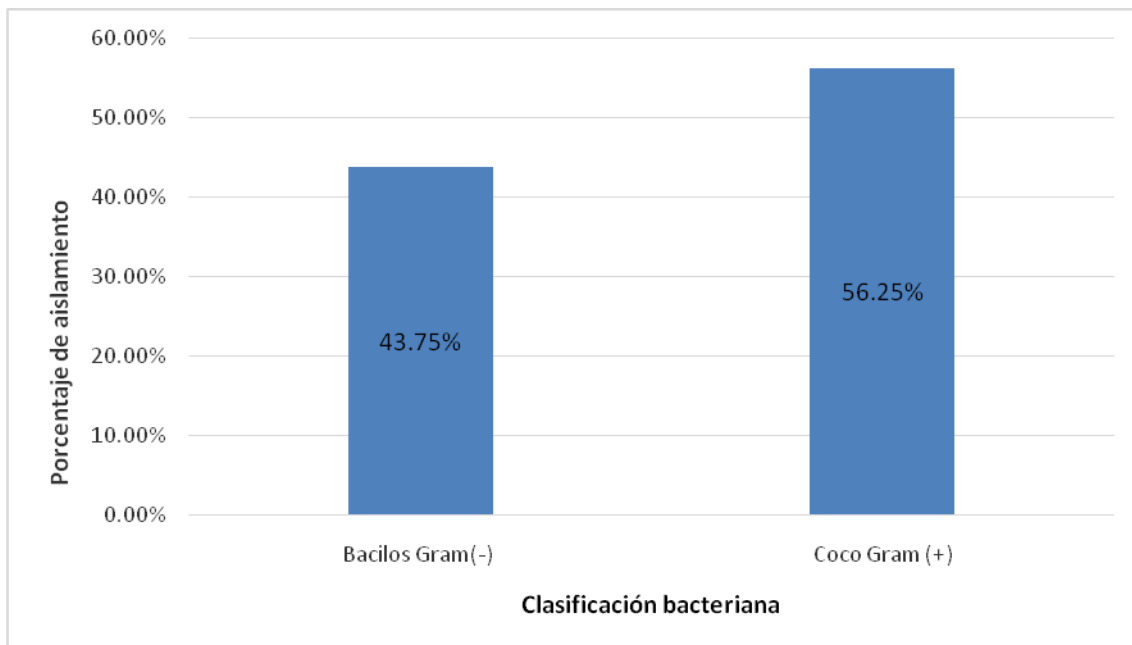


Figura 1.-Porcentaje de aislamiento de bacterias Gram (+) y Gram (-).

6.3 Identificación de bacterias Gram (+)

A las 18 muestras (56.25%), identificadas como Cocos Gram (+) se les realizó la prueba de catalasa donde el 100% resulto positivo a (*Staphylococcus spp*), posteriormente se les aplicó la prueba de coagulasa la cual mostró un 100% de resultados negativos (*Staphylococcus spp* coagulasa negativo; SCN), sin diferencias ($P>0.05$) respectivamente y por último se realizó la prueba de agar sal y manitol donde 13 muestras (72.22%) resultaron negativas y 5 muestras (27.78%) resultaron positivas a la fermentación de manitol, sin diferencias entre grupos ($P>0.05$). De esta forma, 13 muestras (72.22%) obtuvieron un resultado coagulasa negativo y manitol negativo y 5 muestras (27.78%) obtuvieron un resultado coagulasa negativo y manitol positivo (figura 2), los cuales podrían corresponder a los microorganismos sugeridos en el cuadro 8, puesto que solo se realizaron pruebas hasta la identificación del género y no pruebas específicas para la identificación precisa de la especie.

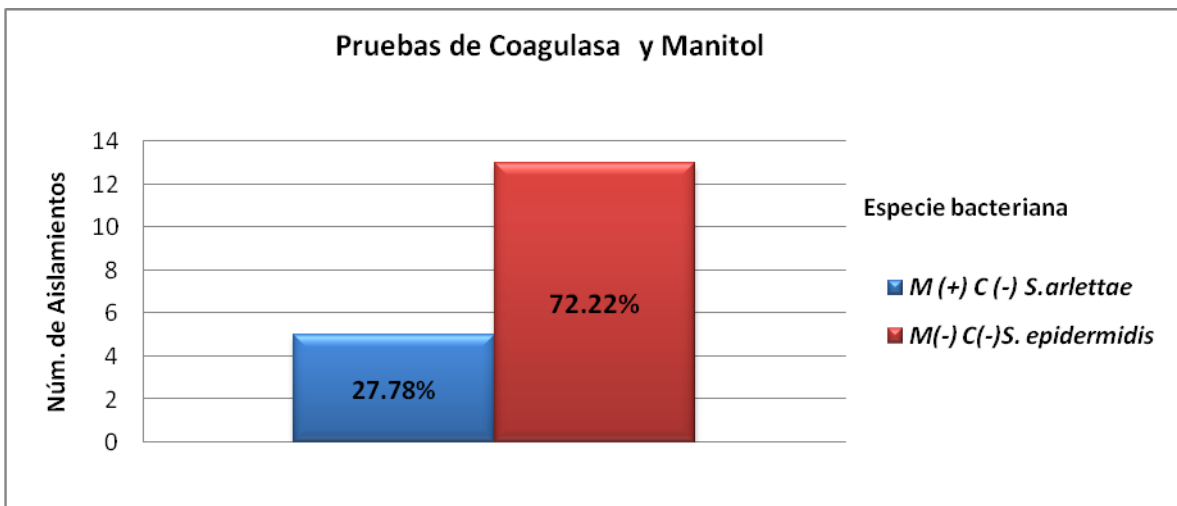


Figura 2. Resultado de las pruebas de identificación de bacterias Gram positivas. M= Manitol, C= Coagulasa, (+)=positivo y (-)= negativo.

Cuadro 8. Bacterias del género *Staphylococcus* coagulasa negativo que corresponden a los resultados de Manitol (+) y Coagulasa (-), Coagulasa (-) y Manitol (-).

Manitol (+) y Coagulasa (-)	Coagulasa (-) y Manitol (-)
<i>S. arlettae</i>	<i>S. epidermidis</i>
<i>S. captis</i> subesp. <i>Captis</i>	<i>S. lugdunensis</i>
<i>S. captis</i> subesp. <i>Ureolyticus</i>	<i>S. schleiferi</i> subesp. <i>Schleiferi</i>
<i>S. simulans</i>	<i>S. auricularis</i>
<i>S. carnosus</i>	<i>S. hominis</i>
<i>S. kloosii</i>	<i>S. saccharolyticus</i>
<i>S. lentus</i>	<i>S. caseolyticus</i>
<i>S. sciuri</i>	<i>S. equorum</i>
<i>S. vitulus</i>	<i>S. gallinarum</i>
	<i>S. muscae</i>

6.4 Identificación de bacterias Gram (-)

A partir de las 14 muestras (43.75%) identificadas como bacilos Gram(-) se realizaron las pruebas IMViC para enterobacterias mostrando 5 diferentes especies de esta familia, sin diferencias entre grupos ($P>0.05$), como se observa en la figura 3.

6.5 Total de bacterias aisladas de útero de vacas sacrificadas en rastro

El total de las bacterias aisladas se muestran en el cuadro 9. Donde SCN, de probable especie *epidermidis*, fue la bacteria aislada con mayor frecuencia (40.62%; $P<0.05$), con respecto a los demás grupos.

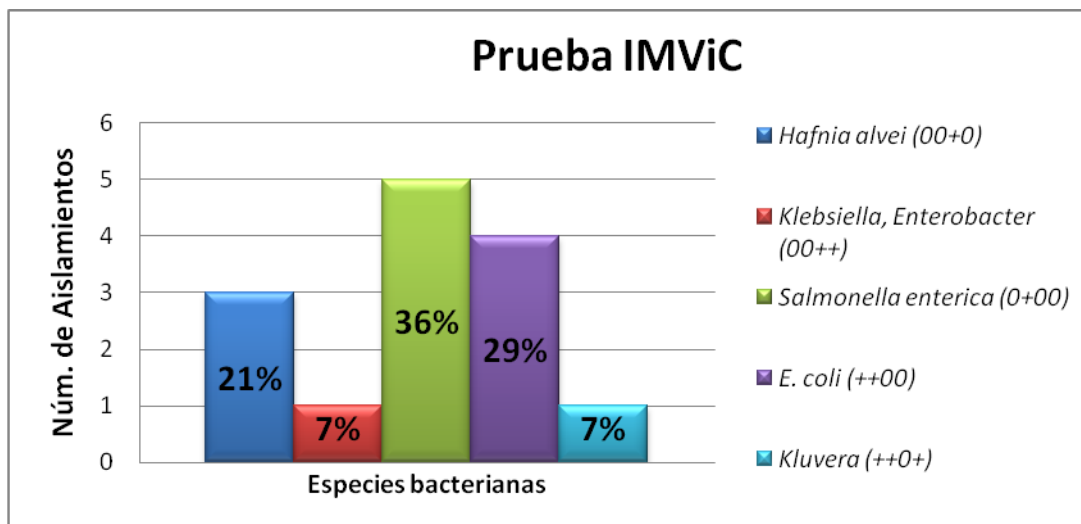


Figura 3. Porcentaje de aislamiento de enterobacterias. Reaccion positiva (+) y negativa (0) para Indol, Rojo de metilo, Voges proskauer y Citrato (IMViC)

Cuadro 9 Porcentaje de bacterias aisladas en útero de vacas como resultado de la identificación primaria a partir de pruebas bioquímicas (Coagulasa (+), Manitol e IMViC).

Microorganismo	Numero de aislamientos	Porcentaje
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	13	40.62 ^a
<i>Staphylococcus arlettae</i>	5	15.62 ^b
<i>Salmonella entérica</i>	5	15.62 ^b
<i>E. coli</i>	4	12.50 ^b
<i>Hafnia alvei</i>	3	9.37 ^b
<i>Klebsiella sp. Enterobacter sp.</i>	1	3.12 ^b
<i>Kluyvera ascorbata</i>	1	3.12 ^b

^{ab} Literales distintas en una misma columna indican diferencia (P<0.05).

VII. DISCUSIÓN

En la presente investigación se realizaron 32 aislamientos bacterianos de úteros de vacas, de los cuales 18 (56.25%) pertenecieron al género SCN, representando la mayoría de los aislamientos. Así mismo 13 (40.62%) de esos aislamientos podrían pertenecer a la especie *Staphylococcus epidermidis* y 5 (15.62%) a *Staphylococcus arlettae*. Estos microorganismos se encuentran de forma natural en la piel de vacas adultas y novillas; sin embargo, han sido aislados en el interior de los pezones, la vagina, el pelaje y las fosas nasales, considerándolos como microorganismos oportunistas (Pyörälä *et al.*, 2009; Boscán *et al.*, 2010). Durante el parto y el puerperio el tracto genital de la hembra está expuesto al medio, y permite que bacterias que normalmente habitan la región perineal y vulvar, asciendan y causen infecciones (Petit *et al.*, 2009; Meléndez *et al.*, 2010). Fernández *et al.* (1984), obtuvieron un 19% de aislamientos de *Staphylococcus spp* a partir de secreciones uterinas en vacas en periodo puerperal; en ese mismo estudio también se obtuvo un 27% de aislamientos en secreciones cervicales de vacas en periodo de gestación. Los *Staphylococcus spp* también han sido aislados en vacas clínicamente sanas en distintas etapas del ciclo estral, como se reportó en un estudio realizado por Fernández *et al.* (2006), quienes obtuvieron un 17% de frecuencia de aislamiento para estos microorganismos a partir de muestras uterinas. Sin embargo, en años más recientes el aislamiento del género *Staphylococcus spp*, relacionado con problemas reproductivos e infertilidad ha ido en aumento como se ha reportado en diversos estudios entre los que destacan Fernández *et al.* (2006), quienes reportaron un 47 % de aislamiento de en vacas

con problemas de fertilidad, por su parte González *et al.* (2007) reportaron un 10.7% de frecuencia de aislamiento en vacas con problemas reproductivos y Escápita (2014) obtuvo un 50% de aislamientos en vacas también con problemas reproductivos. Estos resultados se asemejan a lo obtenido en el presente estudio donde se posiciona a los SCN como los microorganismos mayormente encontrados con el 56.25% del total de los aislamientos. Estos microorganismos forman parte de la microbiota residente de humanos y animales, alojados en piel, mucosas, y son contaminantes ambientales considerados como microorganismos oportunistas cuyo protagonismo como patógeno ha ido en aumento (Pedrari, 2007; Coria *et al.*, 2010; Torre *et al.*, 2012; Fariña *et al.*, 2013). Recientemente *Staphylococcus lugdunensis* una especie de este género fue señalado como agente causal en un caso de aborto en bovinos como se informó en un estudio realizado en Parma, Italia (Ardigó *et al.*, 2014). La capacidad que tiene *Staphylococcus lugdunensis* para causar aborto en el ganado indica una necesidad de implementar procedimientos diagnósticos más precisos para identificar a este y a otros patógenos emergentes cuya presencia es probablemente subestimada en medicina veterinaria (Kleiner *et al.*, 2010). Un estudio realizado en Búfalos demostró que *Staphylococcus epidermidis* era frecuentemente aislado en hembras con retención placentaria y metritis (Azawi *et al.*, 2007), mientras que Madoz (2014), reporto un 12.5% de aislamiento de SCN en vacas con endometritis clínica. Por el contrario Sens (2013) informó que los SCN no afectaban la prevalencia de la endometritis subclínica en vacas. Sin embargo, estos microorganismos que son considerados como parte de la

microbiota normal del útero tienen el carácter de oportunistas y pueden llegar a asociarse con otras bacterias al favorecer su desarrollo e infección del útero como lo reportó Werner (2012), donde mencionó que una infección del útero con SCN aumenta el riesgo de una infección uterina por microorganismos altamente patógenos.

En este estudio no se pudo afirmar con certeza que las vacas a quienes pertenecían los úteros presentaban problemas reproductivos y de fertilidad, debido a que las muestras fueron de úteros procedentes de vacas sacrificadas en rastro y la causa de su eliminación fue desconocida. Sin embargo, se puede inferir que SCN pudo haber causado el desarrollo de una infección uterina (metritis o endometritis), llevando al fracaso en la fertilidad y producción de la vaca; siendo la probable causa de su eliminación al haber representado la mayor frecuencia (56.25%) con respecto a los demás aislamientos en el presente estudio.

Por otro lado el 15.62% de los aislamientos en este estudio correspondió a *Salmonella spp* similar al 16% obtenido por Escápita (2014) en vacas con historial de problemas reproductivos. *Salmonella spp* es una agente oportunista infeccioso que causa una enfermedad en los humanos y los animales (Yáñez *et al.*, 2008). En el ganado bovino *Salmonella dublín* es la especie de este género que está adaptada a su hospedador, causando enfermedad sistémica, abortos y trastornos reproductivos debido a su capacidad de diseminarse vía hematogena (Nielsen, 2003).

E.coli es un microorganismo bacteriano perteneciente al género de las enterobacterias que coloniza el intestino pocas horas después del nacimiento y se le considera como habitante normal del tracto reproductor de hembras bovinas (Sánchez *et al.*, 2011). En el presente estudio se encontró un aislamiento de 12.5% para *E. coli*, estos resultados se asemejan a los obtenidos por Boscán *et al.* (2010) quienes obtuvieron un 11.01% de aislamientos, por su parte Rocha, (2004), reportó 19.6% de aislamientos a partir de secreciones cervicales de vacas con problemas reproductivos, González *et al.* (2007), encontraron 22.2% de aislamientos en vacas con problemas de fertilidad y Fernández *et al.* (2006), reportaron 9.8% de aislamientos en vacas clínicamente sanas respectivamente. A pesar de encontrar a *E. coli* como habitante normal del cérvix de bovinos, este puede convertirse en un germen oportunista altamente patógeno y de gran importancia en el desarrollo de infertilidad y otras afecciones en ganado bovino (González *et al.*, 2007; Boscan *et al*, 2010). Así lo demuestran los altos porcentajes de aislamientos de dicho microorganismo en muestras uterinas de vacas con problemas reproductivos, como el 36% aislado por Sánchez *et al.* (2011), el 29% de aislamiento en vacas con metritis (Palmer, 2007) y un 54% de microorganismos aislados a partir de muestras vaginales de vacas con problemas reproductivos (Escápita 2014), cifras que están por encima del porcentaje de aislamiento de *E. coli* en el presente estudio. También es importante mencionar que su penetración y colonización en el endometrio puede favorecer el desarrollo una infección uterina por otra bacteria altamente patógena como *T. pyogenes* y *F. necrophorum*,

presentando una acción sinérgica sobre otras bacterias (Azawi *et al.* 2007; Williams *et al.*, 2007).

Por otra parte el 9.37% de los aislamientos en el presente estudio correspondió a *Hafnia alvei* una enterobacteria, que forma parte de la microbiota normal de los mamíferos y se comporta como un patógeno oportunista poco común que puede causar infecciones nosocomiales como neumonías, meningitis, infecciones urinarias y abscesos glúteos (Moreno, 2009). Por su parte Fernández *et al.* (2006), realizaron un estudio en vacas clínicamente sanas en diferentes fases del ciclo estral reportando una frecuencia de aislamiento de *Hafnia alvei* del 6.4%, un 7.3% en útero de vacas en periodo puerperal y 7.3% en vacas con problemas de infertilidad, resultados que se asemejan a los obtenidos en este estudio con 9.37% de aislamientos.

Otra bacteria aislada fue *Klebsiella spp* es una bacteria que forma parte de la microbiota uterina normal en novillas (González *et al.*, 2007) que no causa alteraciones o problemas reproductivos (Fernández *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2011). *Klebsiella spp* ha sido aislada en diversos estudios como el realizado por Fernández *et al* (2006) quienes reportaron un 6.3% en vacas gestantes, 1.4% en vacas en fase puerperal y 1.7% en vacas con problemas de fertilidad, resultados que se asemejan a lo encontrado en la presente investigación (3.12% de aislamientos). Por su González *et al.* (2007), Méndez (2008) y Avalos (2014) identificaron a *Klebsiella spp* en un 9.52%, 9.4% y 32.4% de los casos, respectivamente, como una bacteria que forma parte de la microbiota normal en

vacas sin relacionarse a patologías del tracto reproductor en bovinos, lo que difiere con lo obtenido en este estudio, donde el aislamiento fue bajo (3.12% de aislamientos). Sin embargo, existen resultados como los obtenidos por *Sánchez et al.* (2011), quienes reportan un aislamiento del 16.6% a partir de un lavado uterino de aspecto sanguinolento con respuesta inflamatoria que se debe tener en cuenta como posible causante de problemas reproductivos.

Por último se tuvo un aislamiento del 3.12% de *Kluyvera ascorbata*, un microorganismo que pertenece a la familia *enterobacteriaceae*, causante de infecciones predominantemente en tracto urinario (López, 2013). Este microorganismo ha sido aislado en vacas clínicamente sanas a partir de muestras de cérvix y útero con un 4.2% y 6.4%, respectivamente, y 3.5% en vacas en periodo puerperal (Fernández *et al.*, 2006). Estos aislamientos son similares a lo reportado en este estudio considerando a *Kluyvera ascorbata* como parte de la microbiota normal transitoria en el tracto reproductivo.

Es importante mencionar que en la mayoría de los casos las infecciones uterinas de origen bacteriano se favorecen cuando ocurren factores predisponentes para su establecimiento y desarrollo (Recce *et al.*, 2014). Entre los que se encuentran el manejo y medio ambiente dentro de la unidad de producción (estrés, alta producción, nutrición deficiente, etc.), las condiciones alrededor del parto (higiene, distocias, traumatismos, retenciones placentarias y abortos (Sheldon *et al.* 2004). Además de intervenciones como la inseminación artificial, el coito, los exámenes obstétricos entre otros (González *et al.*, 2007).

VIII. CONCLUSIÓN

En conclusión en el presente estudio, los resultados demuestran que en el útero de las vacas sacrificadas en rastro habitan microorganismos bacterianos que forma parte de la microbiota normal del útero. Sin embargo, estas bacterias están descritas como patógenos oportunistas que provocan diferentes grados de infección uterina y son capaces de desarrollar problemas reproductivos con efectos negativos en la fertilidad, motivando a la eliminación del animal.

IX.LITERATURA CITADA

- Alba G, Silveira P. 2006. La leucorrea vaginal bovina de carácter no inflamatorio y su significación clínica. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria. 7:1-20.
- Araínga M, Sandoval N, Zacarías E, Rivera H. 2003. Actinomyces pyogenes causante de abortos en bovinos. Rev Invest Vet Perú. 14:86-88.
- Ardigó P, D'Incau M, Pongolini S. 2014. Abortion in cattle due to infection with Staphylococcus lugdunensis. J. Veterinary Diagnostic Invest. 26:818-820.
- Avalos LT. 2014. Determinación de la flora bacteriana aeróbica normal de vaquillas. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. México.10-35.
- Azawi IO, Omran NS, Hadad JJ. 2007. Clinical, bacteriological, and histopathological study of toxic puerperal metritis in Iraqi Buffalo. J. Dairy Sci. 9:4654-4660.
- Azawi O. 2008. Review: Postpartum uterine infection in cattle, Rev. Anim. Reprod. Sci. 6:187-208.
- Bell MJ, Roberts DJ. 2007. The impact of uterine infection on dairy cow's performance, Theriogenology. 68:1074-179.
- Bell MJ, Wall E, Rusell G, Roberts DJ, Simm G. 2010. Risk factors for culling in Holstein-Friesian dairy cows. Vet.Rec. 167:238-240.
- Bondurant R. 1999.Inflammation in the bovine female reproductive tract. J. Anim. Sci. 77:101-110.
- Bonnett BN, Martin SW. 1995. Path analysis of peripartum and postpartum events, rectal palpation findings, endometrial biopsy results and reproductive performance in Holstein- Friesian dairy cows. Prev.Vet.Med. 21:279-288.
- Boscán OJ, Zambrano NS, Nava J, Portillo MG. 2010. Perfil de la flora bacteriana vaginal. Un riesgo potencial para la reproducción de vacas criollo limonero. Revista Científica. 20:227-234.
- Cabello B, Gómez E, León J, Ramos C. 2002. Prevalencia de la Tricomoniasis bovina en la isla de Guara, municipio Uracoa del estado de Monangas, Venezuela. Revista Científica. 12:617-621.
- Catena M, Cabodevila J. 1999. Evaluación de semen bovino congelado. 24/08/2015, de Sitio Argentino de Producción Animal. Sitio web:

http://www.produccionanimal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/05-evaluacion_de_semen_bovino_congelado.pdf

- Chirinos Z, González-Stagnaro C, Madrid-Bury N, Rivera JC. 2008. Vida útil, longevidad y causas de eliminación en vacas mestizas de doble propósito. *Revista Científica, FCV-LUZ IX*. 6:477-484.
- Córdova IA, Córdova JS, Córdova JA, Pérez GF. 2005. Comportamiento reproductivo del ganado lechero, REDVET. *Revista electrónica de Veterinaria*. 6:1-4.
- Coria LJ, Suárez MR, Robles PM, González CR, Flores VA. 2010. Bacteremia nosocomial por *Staphylococcus hominis*, brote en la unidad de cuidados intensivos neonatales de un hospital de alta especialidad. *Rev Enfermedades infecciosas en Pediatría*. 23:87-92.
- Escápita RE. 2014. Bacterias aeróbicas presentes en vaginas de vacas con problemas de infertilidad. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. México, 1-33.
- FAO. 2012. Estadísticas mundiales. 11-6-2015, de FAO Sitio web: <http://faostat.fao.org/site/377/DesktopDefault.aspx?PageID=377#ancor>
- Fariña N, Carpinelli L, Samudio M, Guillén R, Laspina F, Sanabria R, Abente S, Rodas L, González P y Kaspar HM. 2013. *Staphylococcus* coagulasa-negativa clínicamente significativos. *Rev Chilena Infec*. 30:480-488.
- Farmacopea Nacional Argentina. 2003. Codex Medicamentarius Argentino, Control Microbiológico de Productos no Obligatoriamente Estériles. 1(7):1-5.
- Fernández A, Dimoso ZJ. 1984. Estudio cualitativo y cuantitativo de la flora bacteriológica de las secreciones cérvico-uterinas de vacas clínicamente sanas. *Facultad de Ciencia Animal*. 12:34-54.
- Fernández A, Villavicencio L, Peláez R, Silveira EA, García P, Peraza N. 1985. Estudio cualitativo y cuantitativo de la microflora de secreciones cérvico-uterinas en vacas con repetición de celo. *Rev Cub Reprod Anim*. 10:83-93.
- Fernández MA, Silveira PA, López RO. 2006. Infecciones uterinas en la hembra bovina. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*. 2:1-39.
- Fetrow J, Nordlund KV, Norman HD. 2006. Invited review: Culling: Nomenclature, definitions, and recomendations. *L. Dairy Sci*. 89:1896-1905.

- Földi J, Kulcsér M, Pécsi A, Huyghe B, Lohuis JA, Cox P, Huszenicza G. 2006. Bacterial complications of postpartum uterine involution in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*96:265-281.
- Forero SL. 2004. Conceptos sobre metritis bovina, un problema poco considerado en la ganadería actual, Laboratorios PROVET S.A., Área de reproducción animal.1:1-6.
- Fouz R, Yus E, Sanjuán ML, Diéguez. 2013. Causas de eliminación en rebaños de bovinos lecheros de raza frisona en Control Lechero Oficial, ITEA (en prensa). 20:1-16.
- García ME, Quintela MJ, Taboada G, Alonso B, Varela-Portas C, Díaz M, Barrio JJ, Becerra AI, Peña JD, Herradón PG. 2004. Factores de riesgo de la metritis en vacas lecheras. *Arch. Zootec.* 53:383-386.
- Gilbert RO, Shin ST, Guard CL, Frajblat M. 2005. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology.* 64:1879-1888.
- Gómez AL, Enrique SP. 2006. La leucorrea vaginal bovina de carácter no inflamatorio y su significación clínica. *Revista Electrónica Veterinaria. REDVET.* 7:1-29.
- González JA, Alba LO, Fernández A. 1978. Hallazgos bacteriológicos en secreciones cérvico-vaginales de vacas infecundadas en la provincia de Las Villas. *Rev Centro: Serie Ciencia Anim. Cuba.* 3:57-64.
- González M, Ríos RR, Mattar S. 2007. Prevalencia de bacterias asociadas a la infertilidad infecciosa en bovinos de Montería, Colombia. *Revista MVZ Córdoba.* 12:1028-1035.
- Guzmán AE. 2013. La ozonoterapia intrauterina en el tratamiento de la endometritis subclínica bovina. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca, Ecuador. 1-84.
- Herath S, Dobson H, Bryant CE, Sheldon IM. 2006. Use of the cow as a large animal model of uterine infection and immunity. *J. Reprod. Immun.*69:13-22
- Hernández CJ. 2012. Fisiología clínica de la reproducción de bovinos lecheros, DR, FMVZ. UNAM. 1:79-93.

- Instituto para el Federalismo y Desarrollo Municipal INAFED. 2011. Enciclopedia de los Municipios. 16/06/2015, de SEGOB. Sitio web: http://www.elocal.gob.mx/wb2/EMM_hidalgo.
- Kleiner E, Mook AB, Archer GL, Forbes BA. 2010. Significado clínico de *Staphylococcus lugdunensis* aislado a partir de cultivos de rutina. Clin Infect. 51:801-803.
- LeBlanc SJ, Duffield T, Leslie KE, Bateman KG, Keefe GP, Walton JS, Johnson WH. 2002. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. J. Dairy. Sci. 85:2223-2236.
- LeBlanc SJ, Herdt T, Seymour W. 2004. Factors associated with peripartum serum concentrations of vitamin E, retinol, and b-carotene in Holstein dairy cattle, and their associations with periparturient disease. J. Dairy Science. 87:609-619.
- López LG, Gómez E, Maestre MM, Ruiz CA, Galán DE, González GL. 2013. Bacteremia por *Kluyvera ascorbata* en un paciente adulto, Servicio de Microbiología, Hospital General de Tomelloso, Rev. Esp Qimioter. 26:226-227
- Lozano DR. 2002. Problemas en el Periparto y sus Consecuencias Reproductivas en Vacas Lecheras, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Centro de Investigación Regional Norte Centro, Folleto Científico Núm. 4, México D.F., 1-17.
- MacFaddin. 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Montevideo, Uruguay, Panamericana. 144-150.
- Madoz LV, Giuliodori MJ, Migliorisi AL, Jaureguiberry M, Sota RL. 2014. Endometrial cytology, biopsy, and bacteriology for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows. J. Dairy Sci. 97:195-201.
- Meléndez SM, Valdivia FG, Rangel MJ, Aparicio DE, Segura CC, Guerrero BL. 2010. Factores de riesgo asociados a la presencia de aborto y desempeño reproductivo en ganado lechero de Aguascalientes, México. Rev. Mex. Cienc. Pecu.1:391-491.
- Méndez D. 2008. Determinación de la microflora bacteriana uterina en vacas donantes de embriones. [Trabajo de grado]. Bogotá, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana. 3:23-34.

- Moreno MC. 2009. *Hafnia alvei*. Rev. Chile-Infect. Universidad de Chile. 355.
- Nielsen LR. 2003. Salmonella Dublín in Dairy Cattle: use of diagnostic test for investigation of risk factors and infection dynamics. Department of Animal Science and Animal Health, the Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen.4:1-209.
- Njiro SM, Kidanemariam AG, Tsoetsi AM, Katsande TC, Mnisi M, Lubisi BA, Potts AD, Baloyi F, Moyo G, Mpofu J y Williams R. 2011. A study of some infectious causes of reproductive disorders in cattle owned by resource-poor farmers in Gauteng Province, South Africa. J. South African Vet. Assoc. 82:213-218.
- Otero C, Saavedra L, Silva de Ruiz C, Wilde O, Holgado AR, Nader M E. 2000. Vaginal bacterial microflora modifications during the growth of healthy cows. Lett. Appl. Microbiol. 31:251-254.
- Palmer CT. 2007. Metritis postparto en vacas lecheras. Jornadas de Actualización en Biotecnologías de la Reproducción en Bovinos de IRAC. Córdoba, Argentina.32:1-7.
- Pedrari CS. 2007. Estafilococos coagulasa negativos: el enemigo silencioso. Rev. Argent. Microbiol. 39:1-3.
- Pérez MM. 1996. Interacción inmunoendocrina en el útero: Papel de las hormonas sexuales. Ciencia Veterinaria. 7:191-209.
- Petit, T., J. Spargser, R. Rosengarten, and J. Aurich. 2009. Prevalence of potentially pathogenic bacteria as genital pathogens in dairy cattle. Reprod. Domest. Anim. 44:88–91.
- Piedrahita EL, Montoya ML, Pedraza JF. 2010. Herpes Virus Bovino tipo 1 (BoHV-1) Como posible causa de encefalitis en bovinos de la región de Magdalena Medio Colombiano. Estudio serológico y análisis epidemiológico. Rev. Colomb. Cienc. Pecu. 23:191-198.
- Pinedo PJ, De Vries A, Webb DW. 2010. Dynamics of Culling risk with disposal codes reported by dairy herd improvement dairy herds. J. Dairy Sci. 93:2250-2261.
- Puente E. 2002. Diagnóstico integral del aborto bovino, XI Congreso Venezolano de Producción e Industria animal, Memorias, Venezuela. 1:2-13.

- Pyörälä S, Taponen S. 2009. Coagulase-Negative-staphylococci.emerging mastitis pathogens. Vet.Microbiol.134:1-26.
- Recce BS, Russi N, Massera FA, Signorini PL. 2014. Identificación de Factores de Riesgos Asociados a la Presentación de Endometritis en Bovinos Lecheros. Avances en Ciencias Veterinarias. 29:1-6.
- Rivera H, De la cruz C, Nelson D, Tabacchi L, Adresen H. 2000. Agentes infecciosos asociados con abortos en bovinos lecheros en el valle de Lima, Perú. Resúmenes XXI Congreso mundial de Buiatría. 49-55.
- Rocha AA, Gambarini ML, Andrade MA, Dias de Oliveira FB, Araujo GF. 2004. Microbiota cérvico-vaginal durante o al final de la gestación y puerperio en vacas girolando. Cienc. Anim. Bras. 54:215-220.
- Rodríguez CS, García OR, Torres GJ, Alarcón RB. 2004. Inmunología e Inmunoprofilaxis de la Anaplasmosis bovina. Ciencia Veterinaria. 21:125-163.
- Rodríguez G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *E. coli*. Salud Pública Méx. 44:464-475.
- Sánchez LM, González CC, Castañeda SR, Pulido VA, Guáqueta MH, Aranda SM, Rueda VM. 2011. Evaluación citológica y microbiológica de lavados uterinos en bovinos con problemas reproductivos (estudio preliminar), Rev. MVZ Córdoba. 1:2711-2720.
- SAS. 1982. SAS. Users Guide: Statistics, (version 5 Ed.). Cary, NC, USA Inst. Inc.
- Sens A, Heuwieser W. 2013. Presence of *Escherichia coli*, *Trueperellapyogenes*, α -hemolytic streptococci, and coagulase-negative staphylococci and prevalence of subclinical endometritis. J. Dairy Sci. 96:6347-6354.
- Sheldon IM and Dobson H. 2004. Postpartum uterine health in cattle. Anim. Reprod. Sci. 82-83:295-306.
- Sheldon IM, Gregory L, Leblanc S, Gilbert R. 2006. Defining postpartum uterine disease in cattle. Theriogenology. 65:1516-1530.
- Silveira EA. 2006. Microbiota normal del cuerpo de los animales. Centro de Bioactivos Químicos. Universidad central Marta Abreu de las Villas. Santa clara, Cuba. 2:345-413.

- Stanchi NO. 2007. Microbiología Veterinaria. Buenos Aires, Argentina: INTER-médica.80-95.
- Torre KA, Amarrón DC, Morris DO. 2012. Estudio caso-control de la infección por *Staphylococcus Lugdunensis* aislados de pequeños animales de compañía. Vet. Dermatol. 23(6):476-478.
- Vadillo S, Píris S, Mateos E. 2002. Manual de microbiología veterinaria. Madrid, España: Editorial McGraw Hill interamericana. 45-67.
- Vitela MI, Cruz V, Ramos V P. 2004. Identificación de las causas de desecho en cinco establos lecheros de Aguascalientes, México, Téc Pecú Aguascalientes, México. 42:437-444.
- Werner A, Suthar V, Plöntzke J, Heiwieser. 2012. Relationship between bacteriological findings in the second and fourth week postpartum and uterine infection in dairy cows considering bacteriological results. J. Dairy Sci. 95:7105-7114.
- Williams EJ, Fischer DP, Noakes DE, England GC, Rycroft a, Dobson H, Sheldon I. 2007. The relationship between uterine phatogen growth density and ovarían function in the postpatum dairy cow. Theriogenology. 68:549-559.
- Xolalpa CM, Pérez RM, Córdova IA. 2010. Evaluación de las pérdidas económicas por eventos de falla reproductiva asociadas a brucelosis bovina en hembras y explotaciones de la cuenca lechera de Tizayuca, Hidalgo, México, Revista Científica, FFC-LUZ. 20:190-195.
- Yáñez E, Máttar S, Durango A. 2008. Determinación de *Salmonella spp.* por PCR en tiempo real y método convencional en canales de bovinos y en alimentos de la vía pública de Monteíra, Córdoba. Asociación Colombiana de Infectología. 12:246-254.

X. ANEXOS

Anexo 1. Preparación de los medios de cultivo

Agar sangre

Fórmula: Gramos por litro de agua destilada

Agar	15g
Cloruro de sodio	5g
Infusión de músculo cardiaco	10g
Peptona	10g
pH	7.3 ± 0.2

5% de sangre de carnero

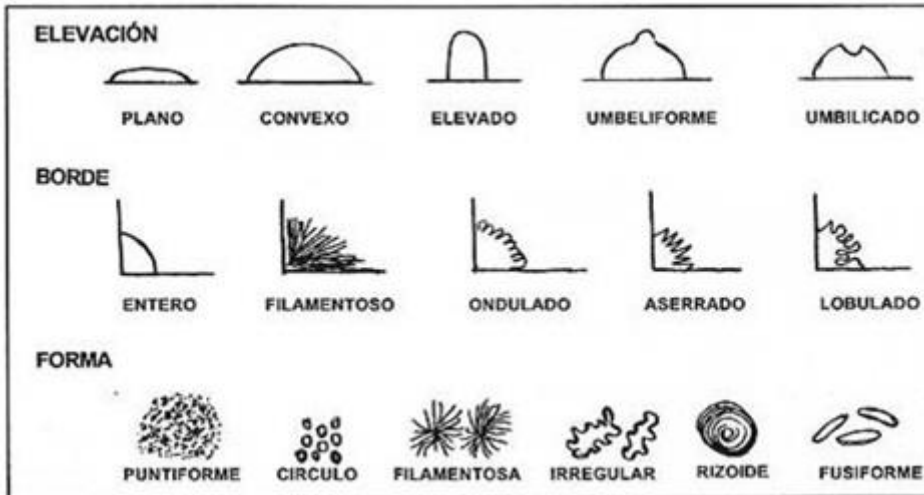
Agar McConkey

Fórmula: Gramos por litro de agua destilada

Agar	13.5g
Cloruro de sodio	5g
Cristal violeta	0.001g
Lactosa	10.0g
Mezcla de sales biliares	1.5g
Peptona especial	3.0g
Peptona de gelatina	17.0g
Rojo neutro	0.03g
pH	7.1 ± 0.2

Mezclar el agar con agua destilada y dejarlo reposar durante 10 minutos y posteriormente esterilizar a 121°C (15 lbs. de presión) durante 15 minutos. Enfriar aproximadamente a 45°C, agregar la sangre de cordero según sea el caso y vaciar el cajas petri estériles (FNA, 2003).

Anexo 2. Morfología del crecimiento bacteriano.



(Stanchy *et al* 2007).

Anexo 3. Tinción de Gram

Materiales

Colorante principal: solución hidroalcohólica de violeta de genciana

Mordiente: solución de lugol

Decolorante: alcohol acetona

Colorante de contraste: solución madre de safranina

Técnica: extendido, secado y fijado clásicos.

Coloración

Violeta de genciana 1 min

Lavado con agua

Lugol.....1 min

Lavado con agua

Alcohol-acetona 10 seg

Lavado con agua

Safranina 45 seg

Lavado con agua, secado y observación.

Interpretación: positivos de color violeta y negativos color rojo (Stanchy *et al* 2007).

Anexo 4 Fundamentos e interpretación de resultados de la prueba de catalasa

La catalasa es una enzima perteneciente a la categoría de las oxidoreductasas que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. (MacFaddin, 2003). La acumulación de peróxido es muy toxico por lo que la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas excepto *Streptococcus spp* producen catalasa, de modo que si se observa burbujeo intenso significa que hay producción de oxígeno, por lo tanto se entiende que hay presencia de la enzima catalasa indicando que la prueba es positiva (*Staphylococcus spp*).

Anexo 5 Interpretación de resultados de las pruebas bioquímicas

Agar sal y Manitol

Los estafilococos crecen en altas concentraciones de sal y pueden o no fermentar el manitol. Los estafilococos coagulasa positiva fermentan el manitol presentando colonias de color amarillo rodeadas o no de un halo amarillo y los microorganismos no fermentadores de manitol presentan colonias del color del medio, rojas rodeadas o no de halo rojizo o púrpura (MacFaddin, 2003).

Coagulasa Positiva

La coagulasa es una proteína producida por varios microorganismos, la cual reacciona con la protrombina de la sangre produciendo estafilotrombina permitiendo que la enzima proteasa convierta el fibrinógeno en fibrina, es decir

que coagula la sangre. La prueba de coagulasa se usa para diferenciar el *Staphylococcus aureus* de los *Staphylococcus* coagulasa negativo (Koneman, *et al.*, 2008).

Se consideraba que la prueba era positiva si el plasma era coagulado en un periodo de 3 a 4 horas (algunas cepas con escasa producción de coagulasa solo coagulan el plasma después de 24 horas de incubación), tratándose así de *Staphylococcus aureus* o bien si no coagulaba se consideraba como negativo considerando al microorganismo como *Staphylococcus* coagulasa negativo. Cabe resaltar que para esta prueba se utilizó un control positivo para corroborar la efectividad de la prueba.

Producción de indol (cultivo en medio SIM)

Motilidad

- Resultado positivo: presencia de turbidez o crecimiento más allá de la línea de siembra.
- Resultado negativo: Crecimiento solo en la línea de siembra

Producción de SH₂

- Resultado positivo: ennegrecimiento del medio de cultivo a lo largo de la línea de siembra o todo el medio.
- Resultado negativo: El medio permanece sin cambio de color

Prueba de indol

Se agregó al medio de cultivo de 3 a 5 gotas del reactivo de Kovac's y después de 20 minutos se leyó el resultado.

- Resultado positivo: aparición de un anillo rojo en la superficie del medio.

Resultado negativo: el color del reactivo permanece incoloro o amarillento (MacFaddin, 2003).

Rojo de Metilo y Voges Proskauer

Revelado y resultados:

Prueba Voges Proskauer: Se añadieron 6 gotas de Sulfato de cobre a 1ml del caldo cultivado, se agito y se dejó reposar durante 10 minutos. Después de dicho tiempo se observó la coloración, siendo positiva si era de color rosado que indica la presencia de acetoína y negativa si el color permanecía ámbar.

Prueba rojo de metilo: Se añadieron 5 gotas de la solución indicadora de rojo de metilo al cultivo y se observó. Si la muestra presentaba una coloración roja, indicaba la presencia de ácidos provenientes de la fermentación de la glucosa siendo positiva, mientras que si la coloración permanecía amarilla constituía una reacción negativa (MacFaddin, 2003).

Agar Citrato

Positivo: crecimiento bacteriano con un intenso color azul en el pico de flauta.

Negativo: Ausencia de crecimiento y permanencia del color verde del medio de cultivo (MacFaddin, 2003).