

Artículo Original. Enero-Abril 2016; 6(1): 22-28. Recibido: 12/12/2015. Aceptado: 13/02/2016.

## **Bacterial study in uterus from slaughtered cows at the municipal slaughterhouse in Tulancingo, Hidalgo**

Estudio bacteriano en úteros de vacas sacrificadas en el rastro municipal de Tulancingo, Hidalgo

**Espinoza-Santillán Diana<sup>1</sup>, Martínez-Juárez Víctor<sup>1</sup>, Peralta-Ortiz Jesús<sup>1</sup>, Molina-Mendoza Pedro<sup>2</sup>, Olave-Leyva José<sup>1</sup>, Ávila-Castillo Rogelio<sup>1</sup>** 

<sup>1</sup>Área Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México. <sup>2</sup>Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México. Rogelio Ávila Castillo. Área Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México. Rancho Universitario. Av. Universidad, Km. 1, Ex-Hda. de Aquetzalpa, AP 32, CP 43600. Tulancingo, Hidalgo, México. [mvzroger2004@gmail.com](mailto:mvzroger2004@gmail.com)

### **ABSTRACT**

The aim of this study was to evaluate the presence and identification of bacterial microorganisms in uterus from slaughtered cows. Thirty-two samples of uterine lavage were obtained, these samples were used to inoculate blood agar and McConkey agar culture media, subsequently these underwent Gram staining for classification in Gram-positive and Gram-negative. A Catalase test, besides a mannitol salt agar culture and coagulase, were performed to the Gram-positive bacteria, while to the Gram-negative bacteria, the IMViC tests were performed. 100% of the samples showed bacterial isolation; from these, 40.62% were coagulase-negative Staphylococcus (SCN), likely epidermis species, representing the highest frequency of bacterial isolates (P <0.05). Among the Gram-negative isolates Salmonella spp. prevailed with 15.62% and 12.5% for Escherichia coli. The results demonstrate that, in the uterus from slaughtered cows at the slaughterhouse, bacterial organisms, live as part of normal microbiota of the uterus, however, these bacteria are also described as opportunistic pathogens that cause different degrees of uterine infection, which may be related with reproductive tract infections, and adverse effects on fertility, encouraging the animal sacrifice.

**Keywords:** cows, uterus, bacteria, Coagulase negative Staphylococcus.

### **RESUMEN**

El objetivo del presente estudio fue evaluar la presencia e identificar los microorganismos bacterianos presentes en úteros de vacas sacrificadas en rastro. Se obtuvieron 32 muestras de lavados uterinos de vacas, las muestras obtenidas fueron sembradas en agar sangre y agar McConkey, posteriormente se les realizó una tinción de Gram para

clasificarlas en Gram positiva y Gram negativa. A las bacterias Gram positiva se les practicaron pruebas de Catalasa, Cultivo en agar sal y manitol y coagulasa, mientras que a las Gram negativa se les realizaron pruebas IMViC. El 100% de las muestras presentó aislamiento bacteriano, de éstas el 40.62% correspondieron a *Staphylococcus* coagulasa negativos (SCN), probable especie *epidermis*, representando la mayor frecuencia de aislamientos ( $P < 0.05$ ). Entre los aislados de Gram negativos predominó el 15.62% para *Salmonella spp* y el 12.5% para *Escherichia coli*. Los resultados demuestran que en el útero, de vacas sacrificadas en rastro, habitan microorganismos bacterianos que forman parte de la microbiota normal del útero, sin embargo estas bacterias también están descritas como patógenos oportunistas, los cuales pudieran relacionarse con infecciones en el tracto reproductor y efectos negativos en la fertilidad, motivando a la eliminación del animal.

**Palabras clave:** vacas, úteros, bacterias, *Staphylococcus* coagulasa negativos.

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades de origen infeccioso y no infeccioso tienen un impacto negativo en los sistemas de producción bovina, ya que afectan de forma significativa la eficiencia reproductiva del hato. Entre los padecimientos más comunes que afectan al aparato reproductor, se encuentran: la retención placentaria, metritis, endometritis, piometra, reabsorciones embrionarias, aborto, anestro, repetición de estro e infertilidad. Estas enfermedades son favorecidas por diferentes factores predisponentes, entre los que se encuentran los relacionados con la higiene, durante y después del parto (Sheldon *et al.*, 2004; Credille *et al.*, 2014), debido a que durante este tiempo el canal genital está temporalmente abierto (Martins y Borges, 2011) y las bacterias que normalmente habitan la región perianal y vulvar, pueden ascender y causar infección (Fernández *et al.*, 2006).

Los problemas reproductivos infecciosos en el ganado bovino son la causa principal de eliminación de vacas, propiciando pérdidas económicas en la producción animal (Orrego *et al.*, 2003), por lo que la temprana y correcta detección del patógeno específico involucrado en las infecciones del tracto reproductor, es esencial para prevenir problemas reproductivos (Fernández *et al.*, 2006; Galvão, 2012).

Por lo anterior el objetivo del presente estudio fue determinar la presencia e identificación de microorganismos bacterianos en útero y su posible relación como causa de eliminación de vacas sacrificadas en rastro.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en el laboratorio de Anatomía y Necropsias, así como en el laboratorio de Investigación de Bacteriología del Área Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, en el Instituto de Ciencias Agropecuarias (ICAp), Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Se obtuvieron 32 úteros de hembras bovinas,

sacrificadas en el rastro municipal de Tulancingo; los úteros se transportaron en bolsas de plástico en forma individual dentro de 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 recuperó la mayor cantidad de líquido posible. Las muestras obtenidas fueron depositadas en tubos Falcon de 15 ml y se centrifugaron a 3500 rpm 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 positivas y Gram negativas), observando su morfología. A las colonias identificadas como Cocos Gram positivos, se les realizaron las pruebas bioquímicas de Catalasa, Cultivo en agar sal y manitol y coagulasa; mientras que a las identificadas como Bacilos Gram negativos, se les realizaron las pruebas IMViC, para realizar la identificación del género y la especie bacteriana. Las frecuencias obtenidas de los grupos anteriormente mencionados fueron analizados con el PROC FREQ (SAS, 1982), mediante la prueba de  $\chi^2$ , a una significancia de 0.05.

## RESULTADOS

### **Aislamiento de bacterias Gram negativas y Gram positivas**

Las 32 muestras uterinas presentaron aislamiento bacteriano, y la tinción de Gram mostró que 18 de estas muestras (56.25%), correspondieron a cocos Gram positivos y 14 muestras (43.75%) a bacilos Gram negativo; sin diferencias entre grupos ( $P>0.05$ ).

### **Identificación de bacterias**

A las 18 muestras identificadas como cocos Gram positivos se les realizó la prueba de catalasa, dando resultado positivo; por lo tanto, se identificó de manera preliminar al género *Staphylococcus* spp; posteriormente se realizó la prueba de coagulasa, dando resultados negativos, e identificando como *Staphylococcus* coagulasa negativo (SCN), sin diferencias significativas ( $P>0.05$ ). Después se realizó la prueba de agar sal y manitol, dando como resultado 27.78% de *Staphylococcus* que fermentan manitol, sin diferencias entre los que no fermentan (72.22%;  $P>0.05$ ).

Asimismo, a partir de las 14 muestras identificadas como bacilos Gram negativos, se realizaron las pruebas IMViC para enterobacterias, mostrando 5 aislados preliminares de esta familia, sin diferencias significativas entre grupos ( $P>0.05$ ; cuadro 1).

### **Total de bacterias aisladas de útero de vacas sacrificadas en rastro**

El total de las bacterias aisladas se muestran en el cuadro 2, donde *Staphylococcus* SCN, posiblemente especie *epidermidis* (manitol +) fue la bacteria aislada con mayor frecuencia (40.62%;  $P < 0.05$ ), con respecto a los demás grupos, que fue de 15.62% para *Staphylococcus* SCN posiblemente especie *arlettae* (manitol -), 15.62% a *Salmonella* spp, 12.5% a *E.coli*, 9.37% a *Hafnia alvei*, 3.12% a *Klebsiella* spp y 3.12% a *Kluyvera ascorbata*.

**Cuadro 1. Pruebas de reacción positiva (+) y negativa (0) para Indol, Rojo de metilo, Voges proskauer y Citrato (IMViC).**

Total de muestras	<i>Hafnia alvei</i> (00+0)*	<i>Klebsiella, enterobacter</i> (00++)*	<i>Salmonella entérica</i> (0+00)*	<i>Escherichia coli</i> (++00)*	<i>Kluyvera</i> (++0+)*
14	3 (21.43)	1 (7.14%)	5 (35.71%)	4 (28.57%)	1 (7.14%)

\*Sin diferencias entre grupos.

**Cuadro 2. 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 <sup>a</sup>
<i>Staphylococcus arlettae</i>	5	15.62 <sup>b</sup>
<i>Salmonella entérica</i>	5	15.62 <sup>b</sup>
<i>Escherichia coli</i>	4	12.50 <sup>b</sup>
<i>Hafnia alvei</i>	3	9.37 <sup>b</sup>
<i>Klebsiella</i> sp. <i>Enterobacter</i> sp.	1	3.12 <sup>b</sup>
<i>Kluyvera ascorbata</i>	1	3.12 <sup>b</sup>

<sup>ab</sup> Literales distintas en una misma columna indican diferencia ( $P < 0.05$ ).

## DISCUSIÓN

La mayor frecuencia de aislamientos bacterianos de la presente investigación fue para el género *Staphylococcus* coagulasa negativo (SCN), sugiriendo la especie *epidermidis* (manitol +) y *arlettae* (manitol -). El género *Staphylococcus* se encuentran de forma natural en la piel de vacas adultas y novillas; sin embargo, también han sido aislados en el interior de los pezones, la vagina, el pelaje y las fosas nasales, considerándolos como microorganismos oportunistas, cuyo protagonismo como patógeno ha ido en aumento (Boscan *et al.*, 2010; Pyörälä y Taponen, 2009). 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; sin embargo, microorganismos como *Staphylococcus* spp 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. En este mismo estudio *Staphylococcus spp.*, se relacionó con problemas reproductivos e infertilidad, al ser reportado con un 47 % de aislamiento en vacas con problemas de fertilidad. Estos resultados se asemejan a lo obtenido en el presente estudio donde se posiciona a los SCN como los principales microorganismos encontrados con el 56.25% del total de los aislamientos.

Por lo tanto, estos microorganismos que son considerados como parte de la microbiota normal del útero y tienen el carácter de oportunistas (Fernández *et al.*, 2006), pueden llegar a asociarse con otras bacterias al favorecer su desarrollo e infección del útero (Werner *et al.*, 2012).

En el presente estudio no se pudo afirmar con certeza que las vacas a quienes pertenecían los úteros presentaban problemas reproductivos y de fertilidad, ya que las muestras fueron de úteros procedentes de vacas sacrificadas en rastro, y la causa de su eliminación fue desconocida. Sin embargo, se ha reportado que *Staphylococcus* (SCN) puede estar presente en vacas con infección uterina (metritis o endometritis; Fernández *et al.*, 2006), la cual pudo llevar al fracaso en la fertilidad; siendo la probable causa de su eliminación, al haber representado la mayor frecuencia (56.25%), con respecto a los demás aislamientos del presente estudio.

El ganado bovino *Salmonella enterica* serotipo Dublín, es una especie mayormente conocida de este género (O'Leary, 2014), que está adaptada a su hospedador, causando enfermedad sistémica, abortos y trastornos reproductivos, debido a su capacidad de diseminarse vía hematógena (Nielsen, 2003). En este estudio también se obtuvo un aislamiento de 15.62% de *Salmonella sp.*, de especie desconocida; sin embargo no se pueden dejar pasar las características patogénicas de este género; y podríamos sugerir que también esté involucrado en este tipo de problemática en la reproducción.

Por su parte *E. coli*, se conoce que coloniza el intestino pocas horas después del nacimiento y se ha reportado como microorganismo presente en vacas con problemas reproductivos (Santos *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2011). En el presente estudio se obtuvo 12.5% de aislamientos para *E. coli*, lo que se asemeja a los resultados obtenidos por Boscán *et al.* (2010) quien obtuvo 11.01% de aislamientos; por su parte González *et al.* (2007), encontró 22.2% de aislamientos en vacas con problemas de fertilidad. A pesar de que se ha reportado a *E. coli* como habitante normal del cérvix y útero de vacas clínicamente sanas, este microorganismo puede convertirse en un agente oportunista altamente patógeno y de gran importancia en el desarrollo de trastornos inflamatorios en útero y responsable de fallas reproductivas en vacas infecundas (Fernández *et al.*, 2006). 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).

Por otra parte, uno de los aislamientos en el presente estudio correspondió a *H. 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 en glúteos (Moreno, 2009). Por su parte Fernández *et al.* (2006), encontró la presencia de *H. alvei* en útero de vacas en periodo puerperal y en vacas con problemas de infertilidad, resultados que se asemejan a los obtenidos en este estudio.

En cuanto a *Klebsiella* spp se conoce que es una bacteria que forma parte de la microbiota uterina normal en novillas (González *et al.*, 2007), que no causa alteraciones o problemas reproductivos (Sánchez *et al.*, 2011). Sin embargo, Fernández *et al.* (2006) reportó 1.7% de aislamientos de este microorganismo en vacas con problemas de fertilidad, resultados que se asemejan a lo encontrado en la presente investigación con 3.12% de aislamientos para *Klebsiella* spp.

Por último, se obtuvo un aislamiento del 3.12% de *K. ascorbata*, lo que resulta similar al 4.2% y 6.4% de aislamientos en muestras de cérvix y útero, respectivamente, en vacas clínicamente sanas; por lo que se considera a este microorganismo como parte de la microbiota normal transitoria en el tracto reproductivo (Fernández *et al.*, 2006).

## CONCLUSIÓN

Se observó que en los úteros de 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 (endometritis, metritis y piometra), los cuales pudieran estar relacionados con infecciones en el tracto reproductor y efectos negativos en la fertilidad; motivando a la eliminación del animal. Por lo tanto, es importante tomar en cuenta la microbiota que habita en el tracto uterino y las situaciones de riesgo asociadas a las infecciones uterinas, que permitan minimizar las tasas de eliminación y los efectos desfavorables sobre la eficiencia reproductiva y la producción.

## LITERATURA CITADA

BOSCÁN OJ, Zambrano NS, Nava J, Portillo MG. Perfil de la flora bacteriana vaginal. Un riesgo potencial para la reproducción de vacas criollo limonero. *Revista Científica*. 2010; 20:227-234.

CREDILLE BC, Woolums AR, Giguere S, Robertso T, Overton MW, Huerley DJ. Prevalence of bacteremia in dairy cattle with acute puerperal metritis. *J Vet Intern Med* 2014; 28:1606-1612.

FERNÁNDEZ MA, Silveira PA, López RO. Infecciones uterinas en la hembra bovina. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*. 2006; 7(10):1-37.

- Galvão KN. Postpartum uterine diseases in dairy cows. *Animal Reproduction*. 2012; 9:290-296.
- GONZÁLEZ M, Ríos RR, Mattar S. Prevalencia de bacterias asociadas a la infertilidad infecciosa en bovinos de Montería, Colombia. *Revista MVZ Córdoba*. 2007; 12:1028-1035.
- O'LEARY C. Salmonella dublin in Irish cattle. *Veterinary Ireland Journal*. 2014; 4(12):642-643.
- MARTINS TM, Borges AM. Avilacão uterina em vacas durante o puerperio. *Rev Bras Reprod Anim*. 2011; 35:433-443.
- MORENO MC. *Hafnia alvei*. *Revista Chilena de Infectología*. 2009; 26: 355.
- NIELSEN LR. *Salmonella* Dublín in Dairy Cattle: use of diagnostic test for investigation of risk factors and infection dynamics (Ph.D. Thesis). University of Copenhagen. 2003.
- ORREGO AJ, Delgado CA, y Echeverría C. L. Vida productiva y principales causas de descarte de Vacas Holstein en la Cuenca de Lima. *Rev. Inves. Vet. Perú*. 2003; 14:68-73.
- PYÖRÄLÄ S, Taponen S. Coagulase-negative-staphylococci-Emerging mastitis pathogens. *Veterinary Microbiology*. 2009; 134:1-26.
- SÁNCHEZ LM, González CC, Castañeda SR, Pulido VA, Guáqueta MH, Aranda SM, Rueda VM. Evaluación citológica y microbiológica de lavados uterinos en bovinos con problemas reproductivos (estudio preliminar). *Revista MVZ Córdoba*. 2011; 1:2711-2720.
- SANTOS MA, Gilbert RO, Caixeta LS, Machado VS, Texeira LM, Bicalho RC. Susceptibility of *Escherichia coli* isolated from uteri of postpartum dairy cows to antibiotic and environmental bacteriophages. Part II: In vitro antimicrobial activity evaluation of a bacteriophage cocktail and several antibiotics. *Journal of Dairy Science*. 2010; 93(1):105-114.
- SAS (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE). User's Guide: Statistics, Cary, NC, USA Inst. Inc. 1982.
- SHELDON IM, Dobson H. Postpartum uterine health in cattle. *Animal Reproduction Science*. 2004; 82-83:295-306.
- WERNER A, Suthar V, Plöntzke J, Heiwieser W. Relationship between bacteriological findings in the second and fourth weeks postpartum and uterine infection in dairy cows considering bacteriological results. *Journal of Dairy Science*. 2012; 95:7105-7114.

### AGRADECIMIENTOS

La presente investigación fue financiada por el PRODEP de la Secretaría de Educación Pública, ejercicio 2011 con el folio asignado UAEH-PTC-517.