

Caracterización de la Metritis en Alpacas y el uso del *Bacillus subtilis* en su tratamiento*

* ZAPATA C.¹, CCAMA A.², OLIVERA L.², & BRAVO P.¹

¹Escuela Profesional de Medicina Veterinaria UNSAAC, Cusco, Perú, ²Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNA, Puno, Perú.
E-mail: czapatacoacalla@gmail.com ²albertocs1@yahoo.es ²loliver54@yahoo.com ¹pwbravo@gmail.com

INFORMACIÓN DEL ARTICULO

Art. Recibido 16/julio/2015
Art. Aceptado 19/octubre/2015
online: 30/diciembre/2015

PALABRAS CLAVE:

* Alpaca
* metritis
* endometrio
* efectividad
* Bacillus subtilis
* IgG

RESUMEN

La metritis, enfermedad que causa una baja fertilidad en alpacas fue caracterizada en 80 alpacas vacías. Lesiones histopatológicas del endometrio, cultivo de bacterias, niveles de opsoninas, y la efectividad del *Bacillus subtilis* como probiótico fue evaluado. La presencia de exudado en las glándulas endometriales, presencia de linfocitos, macrófagos, células plasmáticas, fibrocitos, fibroblastos y tejido periglandular a nivel estrato compacto indicaron una inflamación crónica. En los cultivos bacteriológicos se aislaron Arcanobacterium pyogenes. Inmunoglobulina G como indicador de opsonización fue 1576 mg/dL en alpacas metriticas y 166 mg/dL en alpacas sanas (P<0.05). Bacillus subtilis fue 90% eficiente en el tratamiento de metritis.

* Artículo presentado al VII Congreso Mundial en Camélidos Sudamericanos, llevado a cabo en la ciudad de Puno - Perú, los días 28 al 30 de octubre del 2015.

INTRODUCCIÓN

Las alpacas muestran actividad sexual estacional que dura de diciembre a marzo, durante la cópula el pene de los machos penetran en la cérvix y depositan el semen en el útero (Sumar, 2000). Esta penetración, provoca lesiones como son hemorragias multifocales en un 60% así como procesos infecciosos (Apaza, 1995), y representa una causa de infertilidad (Sumar, 2000). Esta metritis puede ser de carácter post-parto y post-empadre presenta una prevalencia de 21.3% en hembras de saca (Condori, 2010), y 1.3 % en tuis (Novoa y Florez, 1991), además provoca 0.21% de mortalidad (Mamani, 2009). En consecuencia a diferencia de otras especies poco se sabe a cerca de la patogenia, evolución y tratamiento de estas afecciones en los camélidos, utilizándose protocolos descritos para otras especies especialmente de vacas y yeguas (Tibary y Anouassi, 2001). Donde los esquemas de tratamiento se basan en el uso de sustancias hormonales y antibacterianas (Novoa y Florez, 1991) así como también de sustancias antisépticas (Galina y Valencia, 2008), que puede generar problemas de resistencia a los antibióticos. El uso de probióticos puede ser una estrategia de tratamiento (Mombelli y Gismondo, 2000), siendo el *Bacillus subtilis* una bacteria ampliamente estudiada por producir una gran variedad de sustancias que tienen propiedades antimicrobianas. (Cutting, 2011).

Por lo tanto el presente trabajo tiene como objetivo el describir las lesiones histopatológicas, identificar los agentes bacteriológicos, medir los niveles de opsoninas en las secreciones uterinas de alpacas y evaluar la efectividad del *Bacillus subtilis* como tratamiento, y de esa forma generar mayores conocimientos y proporcionar mejor información de la especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente estudio se utilizaron 80 alpacas hembras vacías con la parte ventral de la cola con secreciones blanquecinas y purulentas, provenientes de un lote de 520 animales. Para el tratamiento, 40 animales se consideraron grupo control y 40 animales con tratamiento, realizándose 40 hisopados, 3 biopsias para patología y 4 lavados para evaluar las opsoninas.

a. Diagnóstico de la metritis: A los animales seleccionados se les realizó una ecografía transrectal utilizando un ecógrafo portátil marca ALOKA 500, y un transductor intracavitario rectal de 7.5 Mhz. Se evaluó el engrosamiento de la pared uterina, la ecogenicidad de los tejidos, y la presencia o no de secreciones dentro del útero (Tibary y Anouassi, 2001; Bravo y DeWitt, 2006) con la ayuda de un sigmoidoscopio de uso humano con su fuente de luz se realizó la inspección de mucosa vaginal y entrada de cervix.

b. Lesiones histopatológicas: Se utilizó la técnica descrita en alpacas (Apaza, 1995), utilizando la pinza forceps de biopsia de vaquillas, la muestra es colocada en un medio de fijación tamponada y procesadas siguiendo la técnica histológica (Banks, 1996) y procesadas con una batería de coloración hematoxilina-eosina.

c. Determinación de agentes bacteriológicos: Se usó un hisopo estéril, que fue introducido por medio del sigmoidoscopio hasta alcanzar la entrada de la cérvix. El hisopo fue girado dos a tres veces con la mucosa cervical y retirada. Inmediatamente fue colocado en medio de transporte (agua peptonada) y transportado al laboratorio. Los cultivos se realizaron en medio enriquecido agar sangre incubándose en dos

tipos de atmósferas como es anaerobiosis y aerobiosis. Después de 24 a 48 horas de las colonias se describe color, forma, altura, bordes, presencia o no hemólisis, y la identificación morfológica de la bacteria por medio de la técnica de tinción de Gram.

d. Cuantificación de opsoninas: Se realizó un lavado uterino utilizando la técnica descrita por Williamson *et al.* (1983). La concentración de IgG en las secreciones uterinas de animales sanos mediante la prueba de inmunodifusión radial para cuantificación de IgG de camélido en suero o plasma (Triple J Farms Bellingham, WA, USA).

e. Efectividad del *Bacillus subtilis*. Se administró una dosis de 50 ml de suspensión de *Bacillus subtilis* a una concentración de 10^9 . El criterio de clasificación para la efectividad se utilizó los descrito en Cárdenas (2006): Muy efectivo (mayor al 98%), efectivo (90-975%), moderadamente efectivo (80-89) insuficientemente efectivo (menos del 80%).

e. Análisis estadístico: En la determinación de lesiones histopatológicas se utilizó medidas de tendencia central. En la identificación bacteriológica se utilizó Chi Cuadrado. En la determinación de opsoninas se utilizó la prueba de t-Student. En la efectividad del *Bacillus subtilis* se utilizó Chi Cuadrado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Lesiones histopatológicas: En el epitelio uterino superficial se observa la integridad del epitelio, una membrana basal delgada y presencia de linfocitos que tienden a salir a la luz, a nivel de la glándula endometrial el epitelio glandular se mantiene, presencia de linfocitos periglandulares, exudado a nivel de la luz de la glándula y fibrosis periglandular, En el estrato compacto se observa proliferación de linfocitos, células plasmáticas, fibroblastos y fibrocitos y en estrato esponjoso presencia de macrófagos con siderófagos. Estos resultados concuerdan con lo descrito previamente en alpacas (Apaza, 1995) y se tipifican como inflamación crónica tal como lo describe Carlyle y Duncan (1990), Ferreira (2003) y Trigo (1998). El grado de inflamación concuerda con 2B y 3a (Tibary *et al.* 2006) Este tipo de inflamación puede causar la muerte temprana y en caso más graves pueda interferir en la implantación y placentación así como la pérdida embrionaria y/o aborto y se compara con los resultados de mortalidad embrionaria en alpacas debido a infecciones uterinas (Bravo *et al.*, 2010).

Agentes bacteriológicos: el 45% y 32.5% de colonias en un medio aeróbico y anaeróbico respectivamente fueron de color blanco cremoso, medianas de forma irregular, de margen ondulado, no altos y productores de hemólisis, Gram positivos agrupados en forma de empalizada lo que corresponde a la bacteria del género *Arcanobacterium pyogenes*. Esta bacteria se la encuentra en las membranas mucosas y conforman la flora bacteriana normal del tracto reproductivo de las hembras (Biberstein, 1994) se les considera causa común de lesiones supurativas y se le asocia con procesos de piometra y metritis como microorganismo oportunista en infecciones postcoitales (Quinn *et al.*, 2005; Biberstein, 1994). Cebra *et al.* (2014), Bradford (2010) incluye como causante de endometritis en camélidos al *Arcanobacterium pyogenes*. Fowler (2010) indica que en la práctica de la clínica la metritis en camélidos está asociada a *Escherichia coli* y *Arcanobacterium pyogenes* como el segundo microorganismo más prevalente en los cultivos microbianos. Chauhan y Kaushik (1992) donde reporta al *Corynebacterium pyogenes* como único causante de la infección uterina (piometra) en cinco camellos.

Niveles de opsoninas: La concentración media de IgG fue 1576.715±318.148 mg/dl en hembras métricas, y 166.6 mg/dL en hembras sanas (P<0.05) En yeguas con endometritis la concentración en muy pocos animales fue 10 µg/ml Asbury *et al.* (1980), sin embargo en el trabajo de Williamson *et al.* (1983) no encuentran. La IgG juega un rol importante en la defensa del útero porque estos anticuerpos son fundamentales para una eliminación efectiva de las bacterias (Dunlop y Malbert, 2007), a través del proceso de opsonización porque la IgG se fija a un antígeno por sus regiones V, produciendo un cambio conformacional de la molécula que permite que los dominios CH3 interactúen con los receptores Fc de los polimorfonucleares y macrófagos de tal forma que el antígeno es fagocitado con facilidad (Basualdo *et al.*, 2006; Kindt *et al.*, 2007).

Efectividad del *Bacillus subtilis*: La eficacia del tratamiento en dos dosis fue a 90.00%. El *Bacillus subtilis* ha sido ampliamente estudiado por sus efectos beneficiosos y promover la producción de bacteriocinas los cuales pueden servir como barreras antimicrobianas y ayudar a reducir los niveles de microorganismos patógenos, así como incrementar su actividad microbiológica (Monroy *et al.*, 2009). Aún más el *Bacillus subtilis* produce sustancias surfactantes como es la surfactina, iturina A, fengicina (lipopéptido), subtilisina (lipoproteína) que muestran actividad antimicrobiana así como ser agentes antiadhesivos (Cortes *et al.*, 2013).

Conclusión: La metritis en alpacas es producida por varios gémenes donde destaca el *Arcanobacterium pyogenes*, el papel de la IgG parece ser preponderante y el *Bacillus subtilis* parece ser una alternativa eficiente en el tratamiento de esta enfermedad que influye en la fertilidad de las alpacas

BIBLIOGRAFIA

- Apaza, M. A. (1995). Evolución histológica por biopsia de la función endometrial en alpacas huacaya. Puno: Tesis para optar el grado de Médico Veterinario y Zootecnista. UNA.
- Asbury, A, R. Halliwell, G. Foster. (1980). Immunoglobulins in uterine secretions of mares with differing resistance to endometritis. *Theriogenology*, 299-308.
- Banks, W. (1996). *Histología Veterinaria aplicada*. México: El Manual Moderno. S.A. de C.V.
- Basualdo, J, C. Coto, R. De Torres. (2006). *Microbiología Biomédica: bacteriología, micología, virología*. Buenos Aires: Atlante.
- Biberstein, E. (1994). El tracto genital como hábitad de microorganismos. En E. Biberstein, Y. Chung, & M. Ramis, *Tratado de Microbiología veterinaria* (págs. 275-276). España: ACRIBIA.
- Bradford, S. (2010). *Medicina interna de grandes animales*. España: Elsevier España.
- Bravo PW, S. DeWitt. (2006) Fertility problems in female llama and alpaca annual meeting on medicine surgery and reproduction of south American camelid. The Ohio State University. Columbus, OH, USA.
- Bravo PW, D.Diaz, V. Alarcon, C. Ordoñez. 2010. Effect of the reproductive state of female alpacas on embryonic mortality rate. *Am J Vet Res* 71:1096-1099.
- Cardenas, M. (2006). Efectividad del Fenbendazole y prazicuantel en combinación, para el control en dosis única de nemátodos y céstodos en perros. *Revista Investigación Veterinaria Perú*, 20-25.
- Carlyle, T., R. Duncan. (1990). *Patología Veterinaria Vol III*. Buenos Aires: Hemisferio Sur.
- Cebra, C., D. Anderson, A. Tibary, R. Van, L. Johnson. (2014). *Llama and alpaca care: medicine, surgery, reproduction, nutrition and herd health*. Canadá: Elsevier Inc.
- Chauhan, R., R. Kaushik. (1992). Pyometra in camels: Case report. *Br. vet. J.*, 148.
- Condori, E. (2010). Estudio anatomohistopatológico del aparato genital de alpacas hembras beneficiados en el camal de Ñuñoa. Puno: Tesis para optar el título profesional de Médico Veterinario y Zootecnista UNA.
- Cortes, A., I. Troconis., M. Jaramillo. (2013). Surfactantes biológicos con aplicación potencial en tecnología de alimentos: una revisión. *Bioológicas*, 16-23.
- Cutting, S. (2011). Bacillus probiotics. *Food Microbiology*, 214-220.
- Dunlop, R., C Malbert. (2007). *Fisiopatología Veterinaria*. España: ACRIBIA S.A.
- Ferreira, G. (2003). *Patología veterinaria*. Medellín Colombia: Universidad de Antioquia.
- Fowler, M. (2010). *Medicine and Surgery of Camelids*. Estados Unidos: Blackwell Publishing.
- Galina, C., J. Valencia. (2008). *Reproducción de los animales domésticos*. México: Limusa.
- Kindt, T., R. Goldsby., B. Osborne. (2007). *Inmunología de Kubi*. México: Mc Graw Hill.
- Mamani, J. (2009). Causas de mortalidad de alpacas en tres principales centros de producción ubicados en puna seca y húmeda del departamento de Puno. *Revista electrónica de Veterinaria*, 080904.
- Mombelli, B., M. Gismondo. (2000). The use of probiotics in medical practice. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 531-536.

- Monroy, M., T. Barrera., F. Fernandez., L. Mayorga. (2009).
Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas
por bacterias probióticas. Research Gate, 63-72.
- Novoa, C., A. Florez. (1991). Producción de ruminates menores:
Alpacas. Lima: lima.
- Quinn, P., B. Markey, M. Carter. (2005). Microbiología y enfermedades
infecciosas veterinarias. España: ACRIBIA S.A.
- Sumar, J. (2000). Llamas y alpacas. En B. HAFEZ, Reproducción e
Inseminación Artificial en animales (págs. 225-237).
USA: McGraw-Hill Interamericana.
- Tibary, A., A. Anouassi. (2001). Uterine infections in camelidae. Veterinary
Sciences Tomorrow.
- Tibary, A., C. Fite, A. Anouassi, A. Sghiri. (2006). Infectious causes of
reproductive loss in camelids. Theriogenology, 633-
647.
- Trigo, F. (1998). Patología sistémica veterinaria. México: McGRW
HILL.
- Williamson, P., A. Dunning, J. O'connor, W. Penhale. (1983).
Immunoglobulin levels protein concentrations an
alkalinephosphatase activity in uterine flushings from
mares with endometritis. Theriogenology, 441-448.