

Aislamiento de la bacteria *Ureaplasma* sp. en el tracto reproductivo de vacas lecheras de Costa Rica

B.A. León¹, E. Campos², H. Bolaños³, M. Caballero⁴ y M. Padilla⁵

¹ Ministerio de Agricultura y Ganadería, Dirección Regional Pacífico Sur, San Isidro de El General, Costa Rica.

² INCIENSA-DESAF, Apdo. 4, Tres Ríos, Costa Rica.

³ Ministerio de Salud, San José, Costa Rica.

⁴ Laboratorio de Bacteriología, PIET, Escuela de Medicina Veterinaria, Apdo. 86, UNA, Heredia, Costa Rica.

⁵ Cátedra de Reproducción, Escuela de Medicina Veterinaria, Apdo. 86, UNA, Heredia, Costa Rica.

(Rec. 11-V-1993. Acep. 27-X-1993)

Abstract: This is the first report of *Ureaplasma* sp. from the reproductive tract of Costa Rican cows. Among 204 animals sampled from 11 dairy farms in the country's Central Plateau, the infection rate was 0-71%. Isolation was more frequent in vulvo-vestibular (38.7%) than in cervical swabs (23%). *Ureaplasma* was correlated with clinical granular vulvitis symptoms.

Key words: *Ureaplasma*, dairy cows, granular vulvitis, Costa Rica.

La ganadería es uno de los rubros de mayor importancia para la economía de Costa Rica, pero enfrenta problemas nutricionales y por patógenos, que ocasionan una disminución en los índices reproductivos del hato.

De los microorganismos asociados a problemas reproductivos, *Ureaplasma diversum* (Howard and Gourlay 1982) es quizás el menos conocido en Costa Rica, a pesar de que en otras latitudes se ha relacionado con infertilidad, aborto, muerte perinatal y neumonía (Ball *et al.* 1978, Doig *et al.* 1981, Thornter 1982, Miller *et al.* 1983, Ruhnke *et al.* 1984). Se ha relacionado también con inflamación de la vulva y el prepucio.

En el caso de las vacas, esta inflamación se conoce comúnmente como vulvitis granular (VG) y presenta una fase aguda y otra crónica (Doig *et al.* 1981). Durante la aguda hay secreciones vaginales purulentas, que van desde pequeñas cantidades adheridas a la cola y pelos de la vulva, hasta flujos de 60-100 ml. En estos casos, el examen de la vulva revela una mucosa

roja, muy inflamada, con pequeñas pápulas de 1 a 2 mm de diámetro, usualmente alrededor del clítoris. En casos muy severos, las pápulas pueden extenderse a las paredes laterales y a la comisura dorsal. Esta fase podría repetirse con los estros (períodos de celo) y en algunos casos, las descargas purulentas aparecen de cuatro a diez días después de que la vaca ha sido saltada y pueden persistir por tres a diez días. Durante la fase crónica, hay ausencia de material purulento y se observa un declive gradual, tanto de la hiperemia como de las pápulas, síntomas que llegan a desaparecer en un período de seis semanas a tres meses (Ruhnke *et al.* 1978, Doig *et al.* 1980a, Doig *et al.* 1980b, Doig *et al.* 1981).

A pesar de que las infecciones por *Ureaplasma* no presentan signos sistémicos en el ganado afectado, se ha observado que poco tiempo después de ocurrido un brote de VG, el hato presenta una caída drástica en los porcentajes de concepción al primer servicio (Doig *et al.* 1980a, Doig *et al.* 1981, Thornter 1982).

El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de infecciones por *Ureaplasma* sp. en el tracto genital de vacas lecheras del Valle Central de Costa Rica.

MATERIAL Y METODOS

Selección de los animales: Se incluyeron en el estudio 204 vacas provenientes de 11 lecherías de la Meseta Central de Costa Rica (Cuadro 1). Como requisito, cada finca debía tener registros reproductivos actualizados y recibir ayuda veterinaria. De cada una se seleccionaron aproximadamente 20 animales de acuerdo al siguiente criterio: cinco novillas, diez vacas que tuviesen entre uno y tres partos y cinco de más de tres partos.

En 93 animales se realizó una evaluación clínica de la región vulvo-vestibular, al tomar la muestra.

Recolección de la muestra: De cada animal se tomaron dos hisopados, uno de la región vulvo-vestibular (RVV) y otro de la región cervical (RC). Para obtener el primer hisopado se separaron los labios vulvares, se introdujo un hisopo en el vestíbulo vaginal y se frotó vigorosamente contra sus paredes y partes internas de los labios. Se sacó el hisopo separando de nuevo los labios y se colocó la muestra en 2 ml de medio de transporte (NaH_2PO_4 0.21 g, KH_2PO_4 0.11 g, albúmina bovina Sigma A-4503 0.21 g, sacarosa 4.85 g csp 100 ml en agua desionizada pH 6.9). El hisopado cervical se tomó a través de un espéculo vaginal estéril, lubricado con KY (Johnson y Johnson, Nueva Jersey) y se depositó también en el medio de transporte. Las muestras se llevaron al laboratorio en una hielera en un lapso no mayor de 12 horas. Allí se resuspendió el material de los hisopos y se congeló en el medio de transporte a -30°C hasta su procesamiento.

Cultivo: Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y de cada una se inoculó $100\ \mu\text{l}$ en 2 ml de caldo T (Howard and Gourlay 1982), incubándose a 37°C por un período no mayor de 15 días. De los cultivos en caldo que no mostraron turbidez pero presentaron viraje del indicador, se subcultivó $25\ \mu\text{l}$ en placas de agar U (35 x 10 mm) (Ruhnke and Rosendal 1989). Luego se incubaron por cinco días a

37°C con una atmósfera de 85% de nitrógeno, 10% dióxido de carbono y 5% de hidrógeno.

Las placas se revisaron en un microscopio de luz (objetivo 10 x) a las 24 horas y a los 5 días de incubación, buscando colonias típicas ureasa positivas (Ruhnke and Rosendal 1989).

RESULTADOS

Las muestras positivas por *Ureaplasma* (no fue identificado hasta serovariedad) viraron el medio T, generalmente dentro de las primeras 48 horas de incubación, mientras que en agar U las colonias aparecieron usualmente dentro de las primeras 24 horas. A los cinco días esas colonias tenían un mayor desarrollo y una coloración café oscura, producto de la acción de la ureasa (Fig. 1).

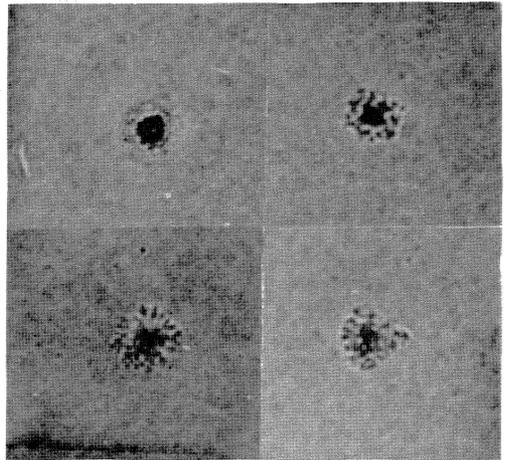


Fig. 1. Morfologías coloniales durante el crecimiento de *Ureaplasma* sp. en agar U. La aparición de zonas oscuras se debe a los depósitos de manganeso por acción de la ureasa. (150 X).

Ureaplasma se aisló con mayor frecuencia de la región vulvo-vestibular (38.7%) que de la cervical (23%). La prevalencia de esta bacteria varió significativamente entre las fincas estudiadas, encontrándose desde una sin animales infectados hasta otra con un 71% de vacas infectadas (Cuadro 1).

Ninguna vaca evaluada clínicamente presentó secreciones purulentas en el momento en que se tomó la muestra; el 47.3% tenía síntomas

CUADRO 1

Prevalencia de Ureaplasma sp. en la RVV y la RC de bovinos en la Meseta Central de Costa Rica, según finca de procedencia

Localización geográfica	No. de animales estudiados	% de aislamiento de <i>Ureaplasma</i>	
		RVV*	RC**
Km 55 Interamericana Sur	19	10.5	5.3
Poasito, Alajuela	21	38.1	19.0
Los Cartagos, Heredia	20	45.0	45.0
Vara Blanca, Heredia	20	35.0	20.0
Vara Blanca, Heredia	17	41.2	17.6
Carrizal, Alajuela	21	71.4	42.9
San Juan del Chicúa, Cartago	13	0.0	0.0
Las Nubes de Coronado, San José	20	30.0	15.0
Cipreses de Oreamuno, Cartago	20	35.0	10.0
Virtudes de Turrialba, Cartago	19	42.1	21.1
Santa Lucía de Barva, Heredia	14	71.4	57.1
Total	204	38.7	23.0

* $p = 0.0004$, por χ^2

** $p = 0.00009$, por χ^2

compatibles con VG crónica (Fig. 2) y en ellas el *Ureaplasma* se aisló en el 54.5%. Las vacas con *Ureaplasma* en la RVV tenían 3.86 veces más riesgo de presentar VG ($p = 0.001$, por χ^2). Por otra parte, las vacas con infección en la RC presentaron 3.12 veces más riesgo de tener vulvitis ($p = 0.02$, por χ^2).

DISCUSION

Ureaplasma diversum es la única especie del género que se ha descrito en bovinos e incluye



Fig. 2. Lesiones típicas de vulvitis granular, con inflamación y numerosas pápulas en la mucosa.

tres serovariedades con distinto grado de patogenicidad (Howard *et al.* 1973, Howard and Gourlay 1982). En Costa Rica se desconoce la importancia de esta bacteria, debido principalmente a las dificultades que presenta su cultivo (Shepard 1973, Shepard 1983). Este trabajo constituye el primer informe sobre la presencia del género en el tracto genital de vacas lecheras de Costa Rica. La caracterización serológica y patogénica de estas cepas, así como varios factores de riesgo, serán objeto de investigaciones posteriores.

En los animales aparentemente sanos, sin signos de VG, *Ureaplasma* se aisló de la RVV en un 23%, resultado similar al obtenido por otros autores en Canadá (23.5% y 37.5%) (Ruhnke *et al.* 1978, Mulira *et al.* 1992). Con relación a la RC se encontró un 11.9% de animales infectados, resultado comparable al observado en Inglaterra (11%) y en Canadá (15%) (Taylor-Robinson *et al.* 1969, Panangala *et al.* 1978). Su aislamiento en animales aparentemente sanos puede deberse a la presencia de portadores asintomáticos (Ruhnke *et al.* 1978) o incluso a la existencia de cepas no patógenas (Howard *et al.* 1973).

A pesar de que en este estudio no se valoraron las consecuencias de la infección por *Ureaplasma* en la reproducción del ganado lechero, sí se demostró una relación estadísticamente significativa entre la presencia de sínto-

mas de VG y el aislamiento de *Ureaplasma*. Las vacas infectadas con ureaplasma, ya sea en la RVV o en la RC, tuvieron tres veces más riesgo de presentar VG que los animales no infectados. Esta asociación entre el aislamiento de la bacteria y la evidencia clínica de VG ha sido previamente señalada (Mulira *et al.* 1992).

En este trabajo el porcentaje de aislamiento de *Ureaplasma* a partir de animales con sintomatología de VG crónica (54.5%) fue semejante al 62.5% informado en Canadá (Mulira *et al.* 1992). Sin embargo, fue menor al 85% observado durante un brote de VG que incluyó 42.5% de animales con síntomas agudos (Ruhnke *et al.* 1978). El mayor porcentaje de aislamiento de ese estudio podría deberse a que la probabilidad de aislar *Ureaplasma* es mayor durante la etapa aguda de infección. Además, se ha demostrado experimentalmente que otros micoplasmas como *M. bovis genitalium* también producen síntomas de vulvitis granular (Doig *et al.* 1980a).

Los estados patológicos causados por *Ureaplasma* se han relacionado, en mayor grado, a la colonización de la RC que de la RVV (Ball and MacCaughy 1979). En este trabajo *Ureaplasma* se aisló con mayor frecuencia en la RVV. Estos resultados demuestran que las prevalencias de infección en la RVV no son comparables con las de la RC, tal como fue sugerido previamente (Ruhnke *et al.* 1978, Ball and MacCaughy 1979). Aunque el riesgo de presentar VG fue semejante, la correlación estadística fue mayor con la RVV, por lo que sugerimos obtener la muestra de esta región para hacer el diagnóstico de VG.

Las diferencias entre fincas podrían deberse a factores de riesgo propios de la raza, al manejo de los hatos o incluso a la existencia de zonas enzoóticas, lo que plantea la necesidad de realizar investigaciones posteriores.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Olga Sánchez y Luz Marina Sánchez su valiosa ayuda técnica, así como a Jorge Piza por su colaboración en informática, a Pedro León por las microfotografías y a Louise Ruhnke por facilitarnos las cepas utilizadas como testigo.

RESUMEN

Se informa del primer aislamiento de *Ureaplasma* a partir del tracto reproductivo de vacas de Costa Rica. Entre los 204 animales estudiados, provenientes de 11 fincas lecheras de la Meseta Central, el porcentaje de infección varió entre 0 y 71%. El aislamiento de *Ureaplasma* sp. fue más frecuente a partir de la región vulvo-vestibular (38.7%) que de la cervical (23%). *Ureaplasma* se correlacionó con la presencia de síntomas clínicos de vulvitis granular.

REFERENCIAS

- Ball, H.J., S.D. Neill, W.A. Ellis, J.J. O'Brian & H.W. Ferguson. 1978. The isolation of mycoplasma from bovine foetuses and their dams. *Br. Vet. J.* 134: 584-589.
- Ball, H.J. & W.J. MacCaughy. 1979. Distribution of mycoplasma within the urogenital tract of cow. *Vet. Rec.* 104: 482-483.
- Doig, P.A., A.L. MacKay & H.L. Ruhnke. 1980a. *Ureaplasma* (T-strain mycoplasma) infection of the bovine reproductive tract. Thirteenth Annual Conference of the American Association of Bovine Practitioners, Ontario, p. 2-21.
- Doig, P.A., H.L. Ruhnke & N.C. Palmer. 1980b. Experimental bovine genital ureaplasmosis. I. Granular vulvitis following vulvar inoculation. *Can. J. Comp. Med.* 44: 252-258.
- Doig, P.A., H.L. Ruhnke, R. Waelchi-Suter, N.C. Palmer & R.B. Miller. 1981. The role of *Ureaplasma* infection in bovine reproductive disease. *Comp. Cont. Educ.* 3: S324-S330.
- Howard, C.J., R.N. Gourlay & J. Brownlie. 1973. The virulence of T-mycoplasma isolated from various animal species, assayed by intramammary inoculation in cattle. *J. Hyg.* 71: 163-170.
- Howard, C.J. & R.N. Gourlay. 1982. Proposal for a second species within genus *Ureaplasma*, *Ureaplasma diversum* sp. nov. *Int. J. Syst. Bact.* 32: 446-452.
- Miller, R.B., H.L. Ruhnke, P.A. Doig, B.J. Poitras & N.C. Palmer. 1983. The effect of *Ureaplasma diversum* inoculated into the amniotic cavity in cows. *Theriogenology* 20: 367-374.
- Mulira, G. L., R.J. Saunders & D.A. Barth. 1992. Isolation of *Ureaplasma diversum* and *Mycoplasmas* from genital tracts of beef and dairy cattle in Saskatchewan. *Can. Vet. J.* 33: 46-49.

- Panangala, V.S., N.A. Fish & D.A. Baunum. 1978. Microflora of the cervico-vaginal mucus of repeat breeder cows. *Can. Vet. J.* 19: 83-89.
- Ruhnke, H.L., P.A. Doig, S.L. MacKay, A. Gagnar & M. Kierstead. 1978. Isolation of *Ureaplasma* from bovine granular vulvitis. *Can. J. Comp. Med.* 42: 151-155.
- Ruhnke, H.L., N.C. Palmer, P.A. Doig & R.B. Miller. 1984. Bovine abortion and neonatal death associated with *Ureaplasma diversum*. *Therigenology* 21: 295-301.
- Ruhnke, H.L. & S. Rosendal. 1989. Useful protocols for diagnosis of animal mycoplasmas. *World Mycoplasma Workshop*. Guelph, Ontario, Canadá, p. 2.
- Shepard, M.C. 1973. Differential methods for identification of T-strain of mycoplasma. *J. Infect. Dis.* 127: S22-S25.
- Shepard, M.C. 1983. Culture media for *Ureaplasma*, p.137-146. *In* S. Razin & J. Tully (eds.). *Methods in Mycoplasmaology*, 1. Academic, Nueva York.
- Taylor-Robinson, D., D.M. Thomas & P.L. Dawson. 1969. The isolation and comparative biological and physical characteristics of T-mycoplasmas of cattle. *J. Gen. Microbiol.* 2: 527-533.
- Thomber, P.M. 1982. *Ureaplasma* association with bovine infertility in South-West Scotland. *Vet. Rec.* 111: 591.