



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Departamento de Genética y Microbiología

Doctorado en Microbiología

Facultad de Biociencias

Universidad Autónoma de Barcelona

“Identificación de la microbiota genital de perros.
Evaluación del potencial probiótico de las bacterias ácido lácticas”

Tesis doctoral dirigida por:

Dra. María de los Ángeles Calvo y Torras

Dra. Teresa Rigau Mas

Dra. María Montserrat Rivera del Álamo

Tutora: María Ramos Martínez Alonso

Memoria presentada para optar al Grado de Doctor

Brian Morales Segovia

2019

M^a de los Angels Calvo Torras, Teresa Rigau i Mas i M^a Montserrat Rivera del Álamo, profesores doctores de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona.

CERTIFIQUEN

Que la tesis titulada “Identificación de la microbiota genital de perros. Evaluación del potencial probiótico de las bacterias ácido lácticas” presentada por el Sr Brian Morales Segovia para optar al grado de Doctor por el Departament de Genètica y Microbiologia de la Universitat Autònoma de Barcelona se ha realizado bajo nuestra dirección y, considerando que está acabada, autorizamos su presentación para ser juzgada por la comisión correspondiente.

Y, para que así conste a efectos que correspondan, firmamos la presente

Bellaterra, el 9 de Setiembre de 2019.

La siguiente tesis doctoral, titulada “Identificación de la microbiota genital de perros. Evaluación del potencial probiótico de las bacterias ácido lácticas” ha sido realizada por el Sr. Brian Morales Segovia.

Y, para que así conste, firma el presente

Bellaterra, el 9 de Setiembre de 2019

Brian Morales Segovia

Agradecimientos

En primer lugar, quisiera agradecer esta Tesis doctoral a mi directora, la Dra. M^a Ángeles Calvo Torras, por haberme dado esta oportunidad. Gracias de todo corazón por haberme apoyado y dirigido durante estos años con tanta bondad, generosidad y entrega, y por haberme inculcado la pasión por la microbiología. También quisiera agradecer a la Dra. Teresa Rigau Mas y a la Dra. Montserrat Rivera del Álamo por su dedicación y apoyo y por habernos facilitado todas y cada una de las muestras que han hecho posible esta Tesis doctoral.

Quisiera agradecer a mis padres, Tere y Carlos, por haberme apoyado desde el primer segundo en que decidí iniciar este camino y por enseñarme que uno puede conseguir todo lo que se proponga y que rendirse nunca es una opción, y a mí hermano, Eloy, por enseñarme desde bien pequeños que, aunque en el camino nos encontremos obstáculos, siempre y siempre hay que sonreírle a la vida.

Quiero agradecer a Leo por ser uno de los pilares más importantes dentro del laboratorio y por su dedicación y apoyo constante. Muchas gracias por no dejar que nunca me viniese abajo, por aconsejarme siempre, por hacerme reír cada día y por hacer que el trabajo duro siempre resulte ameno.

También quisiera darle las gracias a Gisela porque desde el primer día que llegué al laboratorio como estudiante de prácticas vi en ella un ejemplo a seguir.

Para finalizar quisiera agradecer a aquellos compañeros y compañeras, doctores, postdocs y estudiantes de formación profesional, grado y máster que me han acompañado durante este camino: Graciela, Rodrigo, Carlos, Livia, Raquel, Eulàlia, Yaiza, Sara, Laura, Camila, Judit, Iván, Xavi, Patricia, Aida, Àlex, Mariona.

Abreviaciones utilizadas

µL: Microlitro.

µg/mL: Microgramo/mililitro.

% p/v: Porcentaje masa-volumen.

BAL: Bacterias ácido lácticas.

BHI: *Brain Heart Infusion Broth*. Caldo infusión cerebro corazón.

BP: *Baird Parker Agar*

cm: Centímetros.

CEI: Células epiteliales del intestino.

CO₂: Dióxido de carbono.

COS: Columbia agar + 5% sheep blood. Agar Columbia + 5% de sangre de cordero.

CSCR: Con Signos Clínicos Reproductivos.

CVH: *Clinical Veterinary Hospital*. Hospital Clínico Veterinario.

EFSA: European Food Safety Authority. Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria.

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay. Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas.

EMB: *Eosine-Methylene Blue agar*. Agar eosina y azul de metileno.

et al.: *Et alii*. Y otros.

FAO: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Organización de las Naciones Unidas por la Agricultura y la Alimentación.

FHCV: *Fundació Hospital Clínic Veterinari*.

GRAS: *Generally Regarded as Safe Probiotics*. Probióticos generalmente considerados como seguros.

h: Horas

HC: Hembras en Celo.

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno.

MC: *MacConkey Agar*. Agar de cultivo *MacConkey*.

MHCV: Machos del Hospital Clínico Veterinario.

MIC: *Minimal inhibitory concentration*. Concentración mínima inhibitoria.

Min: Minutos.

mL: Mililitro.

mm: Milímetro.

MRS: *Man Rogosa Sharpe Agar*. Agar de cultivo *Man Rogosa Sharpe*.

n.r.: *Not Required*. No requerido.

nm: Nanómetro.

ng/mL: Nanogramo/mililitro.

NZ: Núcleos Zoológicos.

N1: Núcleo Zoológico 1.

N2: Núcleo Zoológico 2.

N3: Núcleo Zoológico 3.

O₂⁻: Superóxido.

OCR: Otros Controles Reproductivos.

OH⁻: Hidroxilo.

pg/mL: Picogramo/mililitro.

°C: Grados Celsius.

R.: *Resistance*. Resistente.

Ref: Referencia.

S: *Sabouraud Dextrose Agar*. Agar de cultivo *Sabouraud*.

S.: *Sensitive*. Sensible.

sp./spp.: Especie/Especies.

TSA: *Tryptone Soya Agar*. Triptona soja agar.

UFC: Unidad formadora de colonia.

WHO: *World Health Organization*. Organización Mundial de la Salud.

Índice

Resumen.....	1
Abstract	2
Introducción	5
1. Microbiota	7
1.1. Microbiota del aparato genital	9
1.1.1. Microbiota del tracto genital del perro	10
1.1.2. Microbiota del tracto genital de la perra.....	12
<i>a) Microbiota vaginal en los diferentes estadios del ciclo sexual.....</i>	<i>15</i>
<i>b) Microbiota vaginal en patologías reproductivas</i>	<i>18</i>
2. Bacterias ácido lácticas y Probióticos.....	21
2.1. Bacterias ácido lácticas	21
2.2. Probióticos	23
2.2.1. Mecanismos de acción generales de los probióticos	24
2.2.1.1. Adhesión a la mucosa intestinal	25
2.2.1.2. Exclusión competitiva de microorganismos patógenos.....	27
2.2.1.3. Producción de sustancias antimicrobianas	27
<i>a) Ácidos orgánicos: ácido láctico.....</i>	<i>28</i>
<i>b) Peróxido de hidrógeno</i>	<i>28</i>
<i>c) Bacteriocinas</i>	<i>29</i>
2.2.2. Acción sobre el sistema inmunitario	30
2.2.3. Seguridad de las cepas probióticas.....	31
2.2.4. Taxonomía de los microorganismos probióticos.....	32
2.2.5. Uso de probióticos para la prevención de enfermedades	33
Objetivos y Plan de Trabajo	39
1. Objetivos.....	41
2. Plan de trabajo.....	42
Material y Métodos.....	43
1. Animales y técnica de muestreo	45
1.1. Origen y obtención de las muestras	45
1.1.1 Origen de los animales de los bloques experimentales.....	45
1.1.2. Obtención de muestras.....	46
2. Técnicas de aislamiento e identificación microbiana.....	48
2.1. Procesado de las muestras	48

a) Siembra e incubación de las placas	48
b) Aislamiento de las colonias.....	49
2.2. Identificación microbiana	50
2.2.1. Características macroscópicas y microscópicas	50
a) Tinción de Gram	50
b) Tinción de esporas	51
c) Tinción de levaduras	52
d) Observación de hongos miceliales.....	52
2.2.2. Pruebas bioquímicas básicas y galerías miniaturizadas.....	53
a) Prueba de la catalasa	53
b) Prueba de la oxidasa	54
c) Actividad hemolítica	55
d) Galerías miniaturizadas.....	56
Kit API® 20 E.....	56
Kit API® 20 NE	58
Kit API® 20 Staph	59
Kit API® 20 Strep.....	60
Kit API® 50 CH	62
Kit API® 20 CAUX	63
3. Análisis estadístico	65
4. Conservación de las cepas aisladas.....	66
4.1. Métodos de conservación microbiana	66
a) Liofilización	66
b) Criopreservación	68
4.2. Determinación de la viabilidad de las cepas tras la criopreservación y la liofilización	69
5. Evaluación de los probióticos	71
5.1. Identificación de las bacterias ácido lácticas	71
5.1.1. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas	71
5.1.2. Pruebas bioquímicas.....	72
5.2. Evaluación del potencial probiótico de las bacterias ácido lácticas.....	72
5.2.1. Determinación de la seguridad de las cepas con potencial probiótico	72
a) Método de difusión en disco	73
b) Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) en cultivo líquido	74
c) Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) en placa de agar	75

<i>d) Determinación de la capacidad hemolítica</i>	76
5.2.2. Evaluación de la resistencia a las condiciones gastrointestinales.....	76
5.2.3. Determinación de la actividad antimicrobiana de las cepas BAL.....	78
<i>a) Primera modificación del método de Kirby Bauer</i>	79
<i>b) Segunda modificación del método de Kirby Bauer</i>	80
Resultados.....	83
1. Identificaciones bacterianas.....	85
2. Aislamientos bacterianos globales de los animales estudiados.....	87
2.1 Resultados de los recuentos microbianos.....	87
2.2. Porcentaje de los microorganismos aislados según el tipo de respiración.....	93
2.3. Porcentaje de cultivos axénicos y mixtos.....	95
2.4. Recuento de microorganismos en hembras.....	97
2.5. Recuento de microorganismos en los machos.....	106
3. Estudio descriptivo de la microbiota genital en los Núcleos Zoológicos.....	113
3.1. Resultados de los recuentos microbianos.....	113
3.2. Porcentaje de microorganismos según el tipo de respiración.....	117
3.3. Porcentaje de cultivos axénicos y mixtos.....	117
3.4. Aislamientos en el Núcleo Zoológico 1.....	119
3.5. Aislamientos en el Núcleo Zoológico 2.....	121
3.6. Aislamientos en el Núcleo Zoológico 3.....	123
3.7. Aislamientos en las Hembras de los Núcleos Zoológicos.....	125
3.8. Aislamientos en los Machos de los Núcleos Zoológicos.....	127
3.9. Porcentaje de cultivos axénicos y mixtos obtenidos en machos y hembras de los Núcleos Zoológicos.....	128
4. Estudio descriptivo de la microbiota genital en pacientes de la FHCV.....	137
4.1. Resultados de los recuentos microbianos.....	137
4.2. Porcentaje de microorganismos según el tipo de respiración.....	141
4.3. Porcentaje de cultivos axénicos y mixtos.....	142
4.4. Aislamientos en las perras Con Signos Clínicos Reproductivos (CSCR).....	144
4.5. Aislamientos en las Hembras en Celo (HC).....	146
4.6. Aislamientos en las perras de Otros Controles Reproductivos (OCR).....	148
4.7. Aislamientos en los Machos del Hospital Clínico Veterinario.....	150
5. Recuentos bacterianos en los animales con patología reproductiva.....	152
5.1. Resultados de los recuentos microbianos.....	152

5.2. Aislamientos en las Hembras con Vaginitis	154
5.3. Aislamientos en las Hembras con Vulvitis	156
5.4. Aislamientos en Hembras con Piometra	158
5.5. Aislamientos en la Hembras con Masa Uterina	160
6. Resultados de la conservación de las cepas aisladas	162
6.1. Resultados de la viabilidad de los liófilos	162
6.2. Resultados de la viabilidad de las crioperlas	164
6.3. Comparación entre métodos de conservación	166
7. Potencial probiótico de las bacterias ácido lácticas.....	168
7.1. Resultados de la selección de cepas BAL potencialmente probióticas	168
7.1.1. Características de las cepas preseleccionadas.....	168
7.2. Resultados de la evaluación de la seguridad de las cepas preseleccionadas	170
7.2.1. Resultados del análisis de la sensibilidad a los antibióticos.....	170
7.2.2. Resultados de la evaluación de la capacidad hemolítica	172
7.3. Evaluación de la resistencia a las condiciones gastrointestinales.....	173
7.4. Resultados de la actividad antimicrobiana de las cepas BAL.....	174
Discusión	177
1. Discusión de las identificaciones bacterianas.....	179
2. Discusión de los aislamientos bacterianos globales de los animales estudiados	180
2.1. Discusión de los recuentos microbianos	180
2.2. Discusión de los porcentajes de los microorganismos aislados según el tipo de respiración.....	182
2.3. Discusión del Porcentaje de cultivos axénicos y mixtos	183
2.4. Discusión del recuento de microorganismos en hembras.....	183
2.5. Discusión del recuento de microorganismos en machos	186
3. Discusión del estudio descriptivo de la microbiota genital en los Núcleos Zoológicos	191
3.1. Discusión de los recuentos microbianos	191
3.2. Discusión de microorganismos según el tipo de respiración.....	191
3.3. Discusión de los aislamientos microbianos entre los diferentes Núcleos Zoológicos....	193
3.4. Discusión de los aislamientos obtenidos en hembras y machos del mismo entorno	195
3.5. Discusión de los aislamientos obtenidos entre hembras y machos de entornos diferentes	196
4. Discusión de los aislamientos en los Grupos del Hospital Clínico Veterinario	198
4.1. Discusión de los aislamientos obtenido en Hembras en Celo (HC).....	199
4.2. Discusión de los aislamientos de bacterias ácido lácticas en las Hembras en Celo	201

4.2.1. Discusión sobre los aislamientos obtenidos en hembras castradas y hembras enteras.....	202
4.3. Discusión de los aislamientos obtenidos en las hembras para Otros Controles Reproductivos.....	204
4.4. Discusión de los aislamientos obtenidos en las hembras Con Signos Clínicos Reproductivos.....	205
4.4.1. Discusión de los aislamientos obtenidos en casos de vaginitis.....	206
4.4.2. Discusión de los aislamientos obtenidos en los casos de piometra.....	207
4.4.3. Discusión de los aislamientos obtenidos en hembras sanas y enfermas.....	209
4.5. Discusión de los aislamientos de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	211
4.6. Discusión de los aislamientos de <i>Streptococcus</i> β -hemolíticos.....	212
5. Viabilidad de la conservación de las cepas aisladas.....	214
5.1. Discusión de la viabilidad de los liófilos.....	214
5.2. Discusión de la viabilidad en crioperlas.....	214
5.3. Discusión sobre los métodos de conservación utilizados.....	215
6. Evaluación del potencial probiótico.....	217
Conclusiones.....	219
Conclusiones.....	221
Anexos.....	223
ANEXO I.....	225
ANEXO II.....	237
Bibliografía.....	238

Resumen

La microbiota genital de perros y perras sigue siendo un tema poco estudiado. La interacción entre los microorganismos formadores de esta microbiota natural, así como con los microorganismos patógenos podría influir directamente en la salud genital del animal. Del mismo modo, el uso de bacterias ácido lácticas procedentes de esta microbiota podría suponer un método preventivo de patologías del tracto genitourinario.

Los objetivos de esta Tesis doctoral son la identificación de la microbiota genital de perro sanos y castrados, de perros sin castrar, sanos y con alguna patología del tracto genitourinario y la identificación, aislamiento y evaluación del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas procedentes de la microbiota natural del perro/a.

Los resultados obtenidos de las identificaciones de la microbiota genital se observan diferencias en cuanto al microorganismo aislado con más frecuencia en cada bloque de estudio y diferencias en la composición microbiana en los microorganismos aislados con menor frecuencia. Utilizando diversas condiciones de incubación y medios de cultivos se ha podido aislar una amplia diversidad de microorganismos en condiciones aeróbicas y, sobre todo, en condiciones anaeróbicas, ya que la bibliografía referente a microorganismos anaeróbicos de la microbiota genital es escasa. Además, se aislaron cultivos axénicos independientemente de la presencia o ausencia de patología lo que es contrario a la creencia generalizada de que, ante una patología genital, el cultivo axénico obtenido es el responsable de la infección.

De las cepas de bacterias del ácido láctico se han aislado e identificado 13 cepas con posible potencial probiótico. Tan solo 6 cepas muestran potencial probiótico por su seguridad y resistencia *in vitro* a las condiciones gastrointestinales: *Lactobacillus curvatus* 1, *Lactococcus lactis* 1, *Lactobacillus plantarum* 1, *Lactobacillus plantarum* 2, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *delbrueckii* y *Lactobacillus plantarum* 3. Estas bacterias ácido lácticas se

sometieron a una evaluación de actividad antimicrobiana contra 12 microorganismos potencialmente patógenos: *Kocuria* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus* spp., *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua*. En los resultados obtenidos observamos que solo dos cepas de bacterias ácido lácticas, *Lactobacillus plantarum* 1 y *Lactobacillus plantarum* 2, mostraron capacidad antimicrobiana contra todos los microorganismos con potencial patógeno.

Abstract

Genital microbiota of dogs and bitches is a little studied topic. The interaction between the microorganisms that form this natural microbiota, as well as with the pathogenic microorganisms, could directly influence the genital health of the animal. For this reason, the use of lactic acid bacteria from this microbiota could be a preventive method of pathologies of the genitourinary tract.

The objectives of this PhD Thesis are the identification of the genital microbiota of healthy and spayed dogs, of unneutered dogs, healthy and with some pathology of the genitourinary tract, and the identification, isolation, and evaluation of the probiotic potential of lactic acid bacteria from the natural microbiota of dogs.

The results obtained from the identifications of the genital microbiota show differences in the microorganism isolated more frequently in each study block and differences in the microbial composition in the microorganisms isolated less frequently. Using various incubation conditions and culture media, it has been possible to isolate a wide diversity of microorganisms in aerobic conditions and, specially, in anaerobic conditions, since the literature referring to anaerobic microorganisms of the genital microbiota is scarce. In addition, axenic cultures were isolated regardless of the presence or absence of pathology, which is contrary to the general belief that, given a genital pathology, the axenic culture obtained is responsible for the infection.

From the strains of lactic acid bacteria, 13 strains with possible probiotic potential have been isolated and identified. Only 6 strains show probiotic potential for their safety and resistance in vitro to gastrointestinal conditions: *Lactobacillus curvatus* 1, *Lactococcus lactis* 1, *Lactobacillus plantarum* 1, *Lactobacillus plantarum* 2, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *delbrueckii* y *Lactobacillus plantarum* 3. These lactic acid bacteria were evaluated for their antimicrobial activity against 12 potentially pathogenic microorganisms: *Kocuria* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus* spp., *Salmonella* *tiphymurium*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua*. In the results obtained, we observed that only two strains of lactic acid bacteria, *Lactobacillus plantarum* 1 and *Lactobacillus plantarum* 2, showed antimicrobial capacity against all microorganisms with pathogenic potential.

Introducción

1. Microbiota

Las superficies corporales, piel y mucosas, constituyen la puerta de entrada de microorganismos invasores, sean éstos patógenos o no. Por esta razón, todos los seres vivos plantean a este nivel su primera línea de defensa. Se denomina microbiota a la población de microorganismos que habita en la piel y mucosas de los organismos (Brooks *et al.*, 2013). Entre otras funciones, la microbiota, proporciona la primera línea de defensa, con múltiples intervenciones tanto directas como indirectas, contra microorganismos patógenos y contribuye a la maduración del sistema inmunitario (Arribas *et al.*, 2008; Brooks *et al.*, 2013). En cada una de las diferentes localizaciones anatómicas, como pueden ser la piel o las mucosas del tracto respiratorio, de la vagina o del tracto digestivo, podemos encontrar ecosistemas microbianos complejos y adaptados a las particularidades específicas de cada nicho. Estas comunidades tienen un comportamiento simbiótico y mutualista con las células, principalmente intestinales, ya que son imprescindibles para el correcto funcionamiento del cuerpo, mantienen una conexión importante con el sistema inmune y tienen funciones homeostáticas que condicionan el estado de salud (Holst *et al.*, 2003; Brooks *et al.*, 2013; del Campo-Moreno *et al.*, 2018).

Mediante la interferencia bacteriana, la microbiota evita la colonización de piel y mucosas por parte de otros microorganismos que pueden resultar patógenos para el individuo, previniendo así la aparición de enfermedades. Los posibles mecanismos de la interferencia bacteriana comprenden la competencia por los receptores o sitios de unión a las células hospedadoras, la competencia por los nutrientes, la inhibición mutua por medio de productos metabólicos o tóxicos, la inhibición mutua por medio de secreción de agentes antimicrobianos o bacteriocinas, entre otros (del Campo-Moreno *et al.*, 2018). La microbiota normal actúa como barrera biológica que, mediante competición, excluye y evita la entrada de microorganismos exógenos (Ilan, 2009). Así, *Staphylococcus epidermidis* ayuda a controlar la entrada de microorganismos exógenos en la piel y *Lactobacillus acidophylus* y *Lactobacillus plantarum* actúan en la vagina

(Gómez-Lucía *et al.*, 2007). Existen también barreras químicas de defensa entre las que destacan la función del pH ligeramente ácido en la piel y mucosas genitales, la temperatura corporal y sustancias antimicrobianas (Gomez-Lucía *et al.*, 2007). La microbiota natural es inocua y favorable en su ubicación normal dentro del hospedador y en ausencia de anomalías. Sin embargo, puede causar enfermedades cuando un gran número de microorganismos se introduce en el torrente sanguíneo u otros tejidos, gracias a la existencia de factores predisponentes (Brooks *et al.*, 2013).

La supresión de la microbiota normal crea un vacío local parcial que tiende a ser colonizado por microorganismos del ambiente o de otras regiones del organismo. Estos microorganismos se comportan como oportunistas y pueden llegar a convertirse en patógenos (Brooks *et al.*, 2013). Aún así, la microbiota se caracteriza por su gran capacidad de resiliencia (capacidad de adaptación frente a un agente perturbador o una situación adversa, con posterior recuperación del estado inicial cuando cesa la alteración), recuperando su estado natural denominado eubiosis. En algunas ocasiones, la naturaleza de la alteración es tan fuerte que provoca cambios en la composición de la microbiota o en su funcionamiento alcanzando un estado de disbiosis (del Campo-Moreno *et al.*, 2018).

Las bacterias ácido lácticas están ampliamente distribuidas en la naturaleza y se han aislado de diversos alimentos, tierra, plantas verdes, así como también del tracto digestivo y vagina de mamíferos (Ramírez *et al.*, 2011). Las bacterias del género *Lactobacillus* que colonizan la cavidad oral y el tracto gastrointestinal ayudan a mantener en equilibrio la microbiota del tracto reproductivo, evitando así infecciones genitales recurrentes tanto en perros machos como en hembras (Strus *et al.*, 2017).

Siempre se describe y divulga la función que la microbiota intestinal tiene en la salud de un ser humano o animal, pero esta función protectora se produce en todas las mucosas y juega un papel primordial en la mucosa genitourinaria (Suarez, 2013). Los microorganismos beneficiosos pueden actuar sobre el huésped de diferentes maneras dependiendo de la cepa y lugar de actuación, con un efecto metabólico directo sobre la mucosa intestinal, incluyendo efectos de barrera, así como, efectos sobre el sistema inmune, cerebro y epitelio genitourinario (Vizcaíno *et al.*, 2016).

1.1. Microbiota del aparato genital

La mucosa del aparato reproductor también está colonizada por una microbiota que vive en un estado de equilibrio con el hospedador y que parece jugar un papel importante en la resistencia a cualquier tipo de alteración o infección. La microbiota vaginal está formada por una mezcla dinámica de microorganismos aeróbicos, anaeróbicos facultativos y anaeróbicos estrictos, creando un ecosistema vivo que varía a lo largo de la vida y al cual se van incorporando constantemente nuevas cepas (Hafez y Hafez, 2000). Algunos microorganismos están preparados enzimáticamente para sobrevivir y replicarse en el ambiente especial de la vagina, así durante las fases de alto contenido en glucógenos predominan los organismos acidófilos, aunque también están presentes otros microorganismos creando un grupo heterogéneo que forma la microbiota normal. (Hafez y Hafez, 2000). La microbiota presente en el tracto genital de perros y perras con fertilidad probada revela que las bacterias aisladas se consideran, en general, como especies comensales. A menudo, se recogen muestras vaginales en un intento de correlacionar diversos problemas reproductivos (infertilidad, vaginitis, abortos, muertes neonatales) con agentes infecciosos específicos, pero la gran variedad de microorganismos presentes en la vagina no permite, en general, un diagnóstico correcto (Bjurström y Linde-Forsberg, 1992; Nogucchi *et al.*, 2003).

1.1.1. Microbiota del tracto genital del perro

La microbiota fisiológica de la mucosa del prepucio del perro está compuesta por microorganismos aeróbicos que también se pueden aislar en el semen. Esta microbiota se ha aislado tanto en la mucosa prepucial de perros sanos como de perros que padecen de prostatitis bacteriana, orquitis y epididimitis (Berezovsky, 2015). En comparación con las bacterias aeróbicas, las anaeróbicas no se han descrito como microorganismos normales de la microbiota del tracto reproductivo del perro (Berezovsky, 2015). Osborne y Lee (1995) concluyeron que la microbiota habitual del prepucio de perros sanos rara vez causa infecciones en el tracto urinario. Además, esta microbiota juega un papel protector mediante la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos y la prevención de la adherencia de los mismos a las células epiteliales (Berezovsky, 2015).

Las bacterias que forman parte de la microbiota fisiológica del prepucio de perros sanos son *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* spp. (Johnston *et al.*, 2001), además de *Pasteurella* spp., *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus* spp., *Corynebacterium* spp. y *Moraxella* spp. (Verstegen, 1998; Fontbonne, 2006).

Los microorganismos aislados con mayor frecuencia en el semen de perros sin patología reproductiva son *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, estreptococos β -hemolíticos, *Staphylococcus* coagulasa negativos, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Mycoplasma* spp. y *Ureaplasma* spp. Esto es debido a que estas especies bacterianas están también presentes en la parte distal de la uretra, pudiendo contaminarse el semen durante su emisión (Root Kustritz, 2006).

Doig *et al.* (1981) obtuvieron un 84% de crecimiento de *Mycoplasma* en muestras prepuciales y en un 72% en muestras de semen. Si bien no hay prácticamente diferencias entre perros clínicamente normales y perros infértiles en el porcentaje de aislamiento del género *Mycoplasma* en semen, sí que se observan diferencias significativas ($p \leq 0,10$) en muestras prepuciales. El aislamiento de las especies de *Ureaplasma* fue más significativo en perros con enfermedad en el tracto reproductor o infertilidad, observándose en el 69% de las muestras, mientras que en perros normales fue del 0%. Estos resultados sugieren que *Ureaplasma* puede jugar un papel importante en los casos de infertilidad canina.

En casos de balanopostitis, la bacteria aeróbica aislada con mayor frecuencia de la microbiota prepucial es *Escherichia coli*. En menor frecuencia se pueden aislar bacterias tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella* spp. (Root Kustritz, 2001). Sin embargo, Mitjana *et al.* (2016) aislaron a *Streptococcus* spp., *Mycoplasma* spp. y *Staphylococcus* spp. como bacterias más frecuentes. Los géneros *Mycoplasma* y *Ureaplasma* se han podido aislar en porcentajes relativamente mayores en casos de balanopostitis que en el caso de animales sanos (Johnston *et al.*, 2001). Sin embargo, la presencia normal de estos dos últimos géneros dificulta identificarlos como agentes responsables de los casos de balanopostitis en perros (Root Kustritz, 2001). Es importante evitar la eliminación de la microbiota normal del prepucio, ya que esto podría provocar un crecimiento excesivo de bacterias que podrían empeorar el problema inicial, al favorecer el crecimiento de microorganismos de mayor patogenicidad y resistencia a antibióticos (England y von Heimendahl, 2010). El aislamiento bacteriano en animales sanos es importante porque estas bacterias pueden ser patógenas cuando se dan las condiciones adecuadas para ello (Siugzdaite *et al.*, 2019).

En el estudio realizado por Bjurström y Linde-Forsberg (1992), sobre las bacterias aeróbicas del tracto genital del perro, se observó cierta similitud entre las bacterias aisladas del prepucio de machos sanos y las aisladas de los órganos sexuales de hembras. Las bacterias que se aislaron con más frecuencia del prepucio de perros sanos fueron *Pasteurella multocida*, estreptococos β -hemolíticos y *Escherichia coli*. Las especies bacterianas que se aislaron principalmente en cultivo puro fueron *P. multocida*, *Staphylococcus pseudintermedius* y estreptococos β -hemolíticos, mientras que en los cultivos en los que se apreciaba diversidad microbiana se incluían *Pasteurella multocida* con estreptococos β -hemolíticos, *Pasteurella multocida* con *Escherichia coli* o *Escherichia coli* con estreptococos β -hemolíticos. También se observó que existía un efecto de raza sobre la microbiota prepucial y que la microbiota bacteriana es similar entre machos y hembras de la misma raza. Es interesante observar que las especies bacterianas aisladas de perros sementales fueron las mismas que las aisladas en perras del mismo criadero, indicando una posible transferencia durante la monta natural. Por otro lado, estos mismos autores no llegaron a establecer una correlación entre el crecimiento bacteriano y la calidad del semen.

1.1.2. Microbiota del tracto genital de la perra

El tracto vaginal de la perra contiene una gran diversidad de microorganismos, tanto aeróbicos como anaeróbicos, muchos de ellos posibles patógenos oportunistas (Groppetti *et al.*, 2012). Algunas de estas bacterias, como pueden ser *Escherichia coli* y *Streptococcus* spp., están asociadas a abortos espontáneos o, también, a posibles infecciones como vaginitis (Laurusevičius *et al.*, 2008; Groppetti *et al.*, 2012). El estreptococo β -hemolítico, presente en la vagina, se considera una de las principales causas de morbilidad y mortalidad de niños y cachorros en las primeras etapas después del parto (Lennoz-Roland, 2001; Meloni *et al.*, 2013, Guerrero *et al.*, 2018).

Aunque existen diferencias en la composición de la microbiota vaginal en relación a la raza (Bjurström y Linde-Forsberg, 1992), la longitud del pelo parece influir en el grado de crecimiento de microorganismos, siendo mayor en los animales de pelo largo (Schäfer-Somi y Renner, 2018).

Los principales microorganismos aeróbicos aislados en la vagina de perras sanas son *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pasteurella* spp., y *Streptococcus* spp. (α , β -hemolíticos y no hemolíticos) y, con menos frecuencia, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma* spp. y *Acinetobacter* spp. (Root Kustritz, 2006; Laurusevičius *et al.*, 2008; Gunay *et al.*, 2010; Groppetti *et al.*, 2012; Maksimović *et al.*, 2012; Schäfer-Somi y Renner, 2018).

Aproximadamente, el 60% de las perras sanas albergan bacterias aeróbicas en la parte craneal de la vagina y el 90% en la parte caudal (Stornelli *et al.*, 2000). *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. (α , β hemolíticos y no hemolíticos), *Escherichia coli*, *Pasteurella* spp., *Proteus* spp., *Klebsiella* spp. y *Mycoplasma* spp. son considerados potencialmente patógenos (Stornelli *et al.*, 2000). Sin embargo, no se han observado diferencias entre los microorganismos mencionados aislados de perras sanas o de infértiles (Stornelli *et al.*, 2000; Root Kustritz, 2006). Estos microorganismos se consideran oportunistas y pueden causar problemas si se producen lesiones, cambios de pH vaginal, inmunodeficiencia general, cambios hormonales, tratamientos con antibióticos, etc. (Arribas *et al.*, 2008; Delucchi *et al.*, 2008).

Mycoplasmas y *Ureaplasmas* son microorganismos que también forman parte de la microbiota natural de la vagina (Root Kustritz, 2006, Grassi *et al.* 2018). Sin embargo, se han relacionado con casos de infertilidad, muerte embrionaria, aborto y mortalidad neonatal. En el estudio realizado por Stonelli *et al.* (2000), se aislaron micoplasmas en combinación con *Staphylococcus* coagulasa negativo en un 50% de las muestras, en un 40% con *Escherichia coli* y con otras bacterias en el 10%. Estos resultados sugieren que existe una interrelación entre micoplasmas con *E. coli* y micoplasmas con *Staphylococcus* coagulasa negativo, pudiendo jugar, estas asociaciones, un papel en la

producción de enfermedad. La única bacteria aeróbica aislada de la vagina que debe ser considerada como patógena estricta sería *Brucella canis* (Stornelli *et al.*, 2000).

Los microorganismos anaeróbicos o anaeróbicos facultativos que se han podido aislar de la microbiota vaginal de perras sanas son *Bacteroides* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Clostridium* spp., *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Corynebacterium* spp. y bacilos Gram negativos y positivos (Johnston *et al.*, 2001; Groppetti *et al.*, 2012).

Las levaduras también son integrantes de la microbiota vaginal de diferentes especies de mamíferos. En el caso de perras sanas se ha podido concluir que *Candida* spp., *Rhodotorula* y *Malassezia pachydermatis* son parte integrante de la microbiota vaginal de perras sanas (Cleff *et al.*, 2007). *M. pachydermatis* es la levadura que se aísla con más frecuencia en la región perianal seguida de la mucosa vaginal y es un agente etiológico común de infecciones oportunistas dermatológicas y óticas caninas (Ledbetter y Starr, 2015) y con potencial zoonótico (Brito *et al.*, 2009). *Candida* spp. es también una levadura comensal de la vagina y de la zona perianal, aunque puede producir problemas en pacientes inmunodeprimidos (Schultheiss *et al.*, 1999; Brito *et al.*, 2009).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) forman parte también de la microbiota vaginal tanto de perras sanas como de perras enfermas, incluidos los animales tratados con antibióticos, lo que sugiere que estas bacterias pueden ser estables en una variedad de condiciones (Hutchins *et al.*, 2013). En perras sanas, las BAL que se han identificado son *Lactobacillus* y *Enterococcus*, incluyendo las especies *Lactobacillus murinus*, *Lactobacillus plantarum* y *Enterococcus canintestini*. (Delucchi *et al.*, 2008; Hutchins *et al.*, 2013). Girmé *et al.* (2013), observaron que las BAL, *Lactobacillus* y *Lactococcus*, eran las bacterias mayoritarias en la microbiota vaginal de perra. *Lactococcus* spp. y *Lactobacillus* spp. se aislaron en un 53% de perras en celo y en un 50% de perras castradas, mientras que *Bifidobacterium* spp. y *Leuconostoc* spp. se diagnosticaron solo en perras castradas (Morales *et al.*, 2018).

a) Microbiota vaginal en los diferentes estadios del ciclo sexual

La perra se puede definir como monoéstrica, con escasa o nula estacionalidad, múltipara, con ovulación espontánea y con una fase luteal de larga duración seguida de un anestro obligado de duración variable, lo que da como resultado un intervalo entre los ciclos que puede oscilar entre 5 y 12 meses (Hoffman *et al.*, 1996; Concannon, 2010). El ciclo sexual está dividido en 4 fases: proestro, estro, diestro y anestro. Estas fases reflejan, respectivamente, el aumento de los estrógenos en la fase folicular, el inicio de la fase luteal en la cual aumenta la progesterona y disminuyen los estrógenos, una larga fase luteal con niveles altos de progesterona y la fase de anestro con niveles hormonales basales hasta el inicio del siguiente ciclo (Concannon, 2010).

En los mamíferos, el ciclo sexual se caracteriza por cambios mediados por hormonas que provocan modificaciones morfológicas y citológicas del tracto reproductivo, específicamente en la vagina (Cleff *et al.*, 2007). La fase de celo es un importante factor de estrés, que asociado a variaciones hormonales puede provocar la aparición de cambios en los mecanismos físicos, químicos e inmunológicos normales que limitan la colonización microbiana de la piel y las mucosas (Cleff *et al.*, 2007). Siugzdaite *et al.* (2018a) observaron que el pH de la vagina de perras clínicamente sanas puede variar en las diferentes fases del ciclo sexual. Durante el celo, el epitelio de la mucosa vaginal, compuesto por células ricas en glucógeno, se exfolia y suministra un sustrato idóneo para los lactobacilos que forman parte de la microbiota local (Delucchi *et al.*, 2008). La cantidad de moco vaginal secretado por las glándulas en el cérvix varía durante las fases del ciclo estral. Durante el estro, la secreción de moco vaginal alcanza su producción máxima y es posible que exista una correlación entre la proliferación de la microbiota y la secreción de moco debido a que, al estar formado de mucopolisacáridos, sirve como fuente de alimento para los microorganismos (Noguchi *et al.*, 2003).

Según el estudio de Noguchi *et al.* (2003) la población de microorganismos aeróbicos y anaeróbicos en la vagina de perras eran comparables tanto en número como en prevalencia, sin embargo, el número total de bacterias

durante el estro fue significativamente superior a las otras fases del ciclo estral. Dichos autores sugieren que la microbiota vaginal se ve afectada por el pH, los potenciales redox, las células epiteliales, las hormonas, la presencia de mucina, la concentración de agentes antimicrobianos y las condiciones biológicas.

Maksimović *et al.* (2012) demostraron que las fases del ciclo sexual de las perras tienen un efecto significativo en el crecimiento de la microbiota vaginal. En la mayoría de citologías vaginales de perras en proestro y estro es fácil identificar un aumento de bacterias vaginales (Noguchi *et al.*, 2003; Laurusevičius *et al.* (2008); Groppetti *et al.*, 2012). En el estudio de Noguchi *et al.* (2003) se aisló un número mayor de microorganismos durante la fase de estro que en las fases de diestro o anestro. Sin embargo, Siugzdaite *et al.* (2018b) encontraron en la fase de diestro un 80% de aislamientos frente a un 73,9% en el proestro, un 77,3% en la fase de estro y un 71,4% en el anestro.

Los microorganismos aislados con más frecuencia durante el estro fueron *Bacteroidaceae* seguido de *Enterobacteriaceae*, bacilos Gram negativos, *Pasteurella multocida*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. y, en menor número, *Lactobacillus* (Noguchi *et al.*, 2003). Sin embargo, Laurusevičius *et al.* (2008) afirman que son *Staphylococcus aureus* y *Pasteurella multocida* las especies más comunes. Siugzdaite *et al.* (2018b) observaron que en la fase de proestro, *Escherichia coli* (21,7%) y *S. aureus* (17,4%) fueron las bacterias más aisladas, mientras que en estro fueron *S. aureus* (22,7%) y *E. coli* (18,2%).

Escherichia coli y *Streptococcus* spp. pueden aislarse en todas las fases del ciclo sexual a excepción del período de gestación. También se ha podido determinar que los estreptococos β -hemolíticos crecen durante la fase de estro y la fase inicial del diestro, mientras que en las demás fases del ciclo sexual se pueden aislar estreptococos α -hemolíticos (Laurusevičius *et al.*, 2008). Durante el diestro y el anestro, la microbiota vaginal puede alterarse y se pueden aislar microorganismos como bacilos, corynebacterias, bacilos Gram positivos anaeróbicos y clostridios que no se aíslan durante el estro (Noguchi *et al.*, 2003). Además de estas bacterias, y según el estudio de Laurusevičius *et al.*,

(2008), durante la fase de anestro, *Staphylococcus aureus* continuaba siendo la especie dominante seguida de *Streptococcus* spp. β -hemolíticos, *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida* y *Pseudomonas aeruginosa*. Sin embargo, durante la fase de diestro, el aislamiento fue mínimo, siendo *S. aureus* la bacteria dominante. Siugzdaite *et al.* (2018b) no encontraron diferencias entre las especies bacterianas encontradas en estas fases de diestro y anestro y las encontradas en las fases de celo.

Del mismo modo, que el efecto hormonal durante el ciclo estral influye directamente sobre la colonización microbiana de la mucosa vaginal, una influencia parecida se observa en especies levaduriformes (Cleff *et al.*, 2007).

Los resultados del estudio realizado por Cleff *et al.* (2007) demuestran que hay una mayor frecuencia de aislamientos de levaduras en la fase de diestro en comparación con las fases de proestro y estro, siendo, en general el anestro la fase con menor aislamiento. Si nos centramos en el aislamiento de levaduras por géneros, se ha observado que *Candida* y *Malassezia pachydermatis* se aislaron con mayor frecuencia durante la fase de diestro y menor durante el anestro. En cuanto a *Rhodotorula*, se aisló con mayor frecuencia en la fase de estro. Es posible que los niveles elevados de aislamiento en diestro sean debido a los niveles séricos elevados de progesterona, la cual actúa como supresor de la inmunidad celular (Cleff *et al.*, 2007). Las frecuencias observadas en la fase de proestro probablemente sean debidas al aumento de los niveles de estrógeno. La acción estrogénica provoca la acumulación de glucógeno que, cuando se metaboliza, se transforma primero en glucosa y posteriormente en ácido láctico. El ácido láctico disminuye el pH vaginal, favoreciendo con ello el desarrollo de lactobacilos y en menor grado de levaduras. Otro factor que podría influenciar en la presencia de levaduras en esta fase del ciclo sería una disminución de inmunoglobulinas G y A por los altos niveles de estrógeno (Cleff *et al.*, 2007).

En la fase de anestro la frecuencia de levaduras aisladas de la cavidad vaginal fue menor debido al nivel basal de las concentraciones hormonales o debido al pH alcalino que favorecería el desarrollo de agentes microbianos suprimiendo la proliferación de levaduras (Cleff *et al.*, 2007).

b) Microbiota vaginal en patologías reproductivas

La microbiota genital de la perra ha sido motivo de estudio en diversas patologías reproductivas como son la vaginitis y la piometra (Guenegou *et al.*, 2015; Siugzdaite *et al.*, 2015; Kekeler y Allen, 2016).

En perras infértiles, la presencia de *Escherichia coli* al inicio del proestro sumado al aumento de la edad de la perra, parece estar asociado a una reducción del tamaño de la camada (Beccaglia *et al.*, 2018).

Marseloo *et al.* (2004) caracterizaron las bacterias aeróbicas encontradas en la parte craneal de la vagina de 76 perras reproductoras con diferentes problemas reproductivos. En 60 de las muestras encontraron bacterias aeróbicas que, en orden decreciente de frecuencia, fueron *Escherichia coli*, *Streptococcus canis*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus* spp. hemolíticos (grupo C) y *Proteus* spp. Estas bacterias eran similares a las descritas en la literatura y encontradas en perras no problemáticas, pero en este caso, las bacterias demostraron una alta resistencia a los antibióticos.

La vaginitis es la inflamación de la vagina y a veces también del vestíbulo vaginal. Puede tener o no un origen infeccioso y afectar a perras de cualquier edad, raza o condición ovárica (Sant'Anna *et al.*, 2012). La vaginitis bacteriana es normalmente secundaria a un desorden hormonal, deficiencias nutricionales, uso de antibióticos profilácticos o condiciones sanitarias pobres que producen un incremento de la proliferación bacteriana (Hashimoto *et al.*, 2002). En general, está causada por especies de la familia *Enterobacteriaceae* o por la propia microbiota del sistema genitourinario inferior. Generalmente, los microorganismos involucrados en los casos de vaginitis son *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Proteus mirabilis* y *vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus*, *Escherichia coli* y *Pasteurella haemolytica*. También pueden aislarse *Klebsiella* spp., *Shigella* spp., y *Citrobacter* spp. (Sant'Anna *et al.*, 2012).

En el estudio realizado por Hashimoto *et al.*, (2002), se identificaron como las principales bacterias causantes de vaginitis a *Staphylococcus* spp. (27,28%), *Proteus* spp. (18,18%), *Streptococcus* spp. (18,18%), *Staphylococcus* coagulasa positivo (9,09%), *Escherichia coli* (9,09%) y *Staphylococcus* coagulasa positivo asociados a *Streptococcus* spp. (18,18%). También se identificaron los géneros *Pasteurella*, *Pseudomonas*, *Mycoplasma* y *Chlamydomphila* como agentes etiológicos frecuentes. Sin embargo, Siugzdaite *et al.* (2018b) citan a *E. coli* (53,6%), *Pseudomonas aeruginosa* (14,5%) y *S. pseudintermedius* (16,7%) como las bacterias con mayor frecuencia de aislamiento. Asimismo, estos autores aislaron bacterias en un 81,3% de las muestras de perras con vaginitis.

Es escasa la literatura enfocada en el estudio de la microbiota vaginal en casos de vaginitis en perra prepúberes. Un estudio realizado por Münnich *et al.* (1999) detectó la presencia de *Staphylococcus* spp. en la parte craneal de la vagina de la mayoría de los casos de vaginitis juvenil.

La piometra se define como la acumulación de material purulento en el interior del lumen uterino y en la perra se considera una infección grave que puede presentar una morbilidad y mortalidad altas (Niskanen y Thrusfield, 1998). Los casos de invasión bacteriana son del tipo oportunista debido a que los microorganismos comúnmente aislados en los casos de piometra forman parte de la microbiota normal de la vagina de la perra (Hagman y Kühn, 2002).

Escherichia coli es el microorganismo que se ha identificado con mayor frecuencia en los casos de piometra canina, aislándose en el 62-90% de los casos (Hagman, 2018). Esto puede deberse al hecho de que se trata de una bacteria que normalmente pertenece a la microbiota vaginal y, por vía ascendente, puede penetrar en el lumen uterino durante el proestro y estro. En el estudio realizado por Hagman y Köhn (2002), se indicó que todas las cepas de *E. coli* presentes en el útero de perras que padecían de piometra eran el mismo clon. También se observó que las perras presentaban infección simultánea del tracto urinario de la misma cepa de *E. coli* aislada en el tracto reproductivo. Por último, estos autores observaron que las cepas de *E. coli*

aisladas tenían un perfil de ADN único en cada perra, lo que apoyaba la teoría de que las cepas de *E. coli* aisladas de las perras con piometra eran originarias de la propia microbiota natural de estos animales. Otras bacterias aisladas en casos de piometra en perras son *Streptococcus* spp., *Klebsiella* spp., *Staphylococcus* spp., *Pasteurella* spp., *Proteus* spp. y *Pseudomonas* spp. (Hagman y Kühn, 2002).

Los casos más graves de piometra son normalmente causados por microorganismos como *Escherichia coli* y *Proteus* spp., en los que el exudado es espeso, viscoso, denso y de color rojo opaco, con un característico olor fétido. En otros casos, como aquellos causados por microorganismos como *Streptococcus* spp. y *Staphylococcus* spp., el exudado es más típicamente purulento (Silva-Molano y Loaiza-Echeverri, 2007). *E. coli* presentó la capacidad de formar biofilms en 23 muestras uterinas y 18 fecales de perros, lo que explicaría la persistencia de la bacteria a pesar del tratamiento (Kekeler y Allen, 2016). La α -hemolisina detectada en el 48% de las muestras de piometra causada por *E. coli* frente al 30% y 19% presente en las muestras de tracto urinario o fecales, respectivamente, podría explicar la gravedad de patogenia de la piometra en la perra (Henriques *et al.*, 2016).

Una disminución de bacterias ácido lácticas podría facilitar la proliferación de bacterias patógenas aumentando así la posibilidad de vaginitis, infecciones urogenitales o piometra (Fieni *et al.*, 2014, Sánchez, 2015).

2. Bacterias ácido lácticas y Probióticos

2.1. Bacterias ácido lácticas

La clasificación de las bacterias ácido lácticas (BAL) está basada en la morfología, en el modo de la fermentación de la glucosa, en la temperatura de crecimiento y en el rango de utilización de azúcar (Khalid, 2011).

Las BAL constituyen un grupo de bacterias Gram positivas, anaeróbicas estrictas o aerotolerantes, generalmente inmóviles, no esporuladas ni pigmentadas, catalasa y oxidasa negativas, en forma de bacilos o cocos y productoras de ácido láctico durante la fermentación de carbohidratos, provocando la acidificación del medio (Carr *et al.*, 2002; Salminen y von Wright, 2004; König *et al.*, 2009; Khalid, 2011; Lahtinen *et al.*, 2012). Las bacterias ácido lácticas son capaces de colonizar hábitats tan diversos como el material vegetal, los productos lácteos y la piel y las mucosas del hombre y los animales. El pH de crecimiento óptimo oscila entre 5,5 y 6,2. En este género se incluyen más de 100 especies con propiedades muy heterogéneas. Se clasifican en mesófilas o termófilas de acuerdo a la temperatura óptima de crecimiento y en homofermentadoras estrictas o en heterofermentadoras facultativas o estrictas, dependiendo de sus características facultativas (Klander y Weiss, 1986) y el producto final de su fermentación. Las homofermentadoras producen principalmente ácido láctico, mientras que las heterofermentadoras pueden producir otros productos como dióxido de carbono, etanol y ácido acético además de ácido láctico (Lahtinen *et al.*, 2012). Las bacterias del ácido láctico incluyen los géneros *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Tetragemonococcus*, *Vagococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weisella*, *Lactococcus* y *Streptococcus* pertenecientes al orden *Lactobacillales* del filo Firmicutes, y el género *Bifidobacterium* que pertenecen al orden *Bifidobacteriales* del filo Actinobacteria (Adams, 1999; Salminen y von Wright, 2004; Lahtinen *et al.*, 2012; Girmé, 2015).

Hoy en día las bacterias ácido lácticas presentan un gran potencial biotecnológico dada su aplicación en los procesos fermentativos destinados al consumo humano y animal (Pérez *et al.*, 2014). La importancia industrial de las BAL se evidencia por ser generalmente reconocidos como seguros (*Generally Regarded as Safe Probiotics*, GRAS), por su presencia ubicua en los alimentos y por su contribución a la microbiota saludable de las superficies humanas. Este último hecho es de gran importancia y la razón por la cual actualmente las BAL también se utilizan para el tratamiento de la disbiosis tanto en humanos como en animales (Girmé, 2015) mejorando la salud intestinal y estimulando el sistema inmunológico (Ramírez *et al.*, 2011; Pérez *et al.*, 2014). Las BAL contribuyen al desarrollo de las características organolépticas y reológicas de los alimentos, al generar, también, ambientes poco favorables para el desarrollo de microorganismos patógenos debido a su capacidad antagónica.

La característica principal de este grupo de bacterias es la producción de ácido láctico como producto principal de la fermentación de carbohidratos. Las BAL despiertan un gran interés por sus características fisiológicas que las hacen buenas candidatas para su uso como probióticos, ya que pueden sobrevivir a las condiciones gastrointestinales del hombre y de los animales. Entre estas características se pueden citar: resistencia a sales biliares, resistencias a bajos valores de pH y la capacidad de crecimiento en una amplia diversidad de temperaturas (Pérez *et al.*, 2014).

2.2. Probióticos

La definición de probiótico propuesta por la FAO (*Food and Agriculture Organization*) y por la WHO (*World Health Organization*) es la de “microorganismos vivos, que cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio de salud al huésped” o “microorganismos vivos, que cuando se ingieren (en la dieta o en fórmulas farmacéuticas), se aplican localmente (tracto urogenital) o en modo aerosol (aparato respiratorio superior), aportan al consumidor uno o varios beneficios probados para la salud” (Sánchez, 2015).

El microbiólogo ucraniano Élie Metchnikoff fue el primero en observar la existencia de microorganismos vivos beneficiosos para la salud. Se le concedió el premio Nobel de Medicina en 1908, cuando descubrió el mecanismo de acción de las leches fermentadas y sus efectos beneficiosos para la salud humana debido a los cambios que se producían en el equilibrio de la microbiota intestinal (Del Coco, 2015). El consumo de yogurt, que contenía bacterias productoras de ácido láctico, provocaba la reducción de las bacterias productoras de toxinas en el intestino y esto se relacionó con la longevidad de estas personas. Fue también el primero en dar nombre al *Lactobacillus bulgaricus*, en honor a los lácticos que consumían los búlgaros (Mackowiak, 2013; Sánchez, 2015).

Un microorganismo, para ser considerado probiótico, debe cumplir los siguientes requisitos (Adelantado y Faura, 2007; West *et al.*, 2009; Sánchez, 2015):

- Formar parte de la microbiota del intestino del hospedador.
- No ser patógeno ni toxicogénico.
- Mantenerse viable en medio ácido del estómago, en contacto con la bilis del duodeno y cambios de pH.
- Poseer capacidad de adhesión a las células epiteliales intestinales
- Adaptarse a la microbiota intestinal sin desplazar a la microbiota autóctona.
- Producir sustancias antimicrobianas, colaborando a controlar la disbiosis.
- Tener capacidad para aumentar de forma positiva las funciones inmunes y las capacidades metabólicas.
- Debe tener un metabolismo facultativo o bien anaeróbico estricto.

2.2.1. Mecanismos de acción generales de los probióticos

Los probióticos son básicos para el bienestar y la salud del hospedador. Representan un método efectivo para el control y prevención de enfermedades, al ser capaces de interferir en el crecimiento y virulencia de los patógenos (Lee *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006; Basu *et al.*, 2007).

La interacción normal entre las bacterias intestinales y su huésped constituye una relación simbiótica (Guarner *et al.*, 2017). La alteración de este equilibrio, bien por la reducción en la población bacteriana autóctona o por el sobrecrecimiento de otras especies, se traduce en la aparición de patologías. Los probióticos aparecen como un tratamiento alentador, ya que restituyen la microbiota normal (Castro *et al.*, 2015). Entre sus mecanismos de acción se incluyen (1) la mejora de la barrera epitelial; (2) el incremento de la adhesión en la mucosa intestinal e inhibición de la adhesión de patógenos (Collado *et al.*,

2006) mediante la producción de sustancias antimicrobianas como ácidos grasos de cadena corta, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas y óxido nítrico. (Dobson *et al.*, 2012); y (3) la modulación de los mecanismos inmunológicos de la mucosa intestinal (Guarner *et al.*, 2017; Bermúdez-Brito *et al.*, 2012; Brown, 2012). Estos mecanismos pueden conducir al antagonismo de patógenos potenciales, a una mejora del ambiente intestinal, a una mejora de la función de la barrera intestinal, a una modulación del perfil de citoquinas y a la activación de macrófagos locales, entre otros beneficios (Guarner *et al.*, 2017).

2.2.1.1. Adhesión a la mucosa intestinal

La adhesión de una cepa a la mucosa intestinal es uno de los principales criterios a la hora de definir un microorganismo probiótico. La adhesión es un pre-requisito para la colonización bacteriana y es de gran importancia para la modulación del sistema inmunológico y constituye el primer mecanismo de defensa contra la invasión de patógenos (Iñiguez-Palomares y Acedo-Félix, 2006; Bermúdez-Brito *et al.*, 2012).

Las células epiteliales del intestino secretan mucina (componente principal del moco) que protege y/o previene la colonización bacteriana mediante la modificación o la inhibición de la asociación bacteriana con la superficie de la mucosa (Juntunen *et al.*, 2001; Collado *et al.*, 2005; González-Rodríguez *et al.*, 2012; Sánchez, 2015). La integridad de la barrera intestinal se mantiene mediante varios sistemas interrelacionados que incluyen la secreción de moco, la secreción de cloruro y agua, y la unión de las células epiteliales en sus uniones apicales mediante proteínas de uniones estrechas (Ng *et al.*, 2008).

Las BAL muestran diversas proteínas de superficie implicadas en la interacción con las células epiteliales intestinales y con el moco intestinal (Beachy, 1981; Conway y Kjelleberg, 1989; Henriksson *et al.*, 1991; Coconnier *et al.*, 1992; Schneitz *et al.*, 1993; Haller *et al.*, 2001; Van Tassell y Miller, 2011). Los probióticos pueden influir en las interacciones célula-célula y en la estabilidad celular potenciando la correcta función de la barrera intestinal, ya sea, modificando las uniones estrechas, disminuyendo la permeabilidad, modificando las proteínas del citoesqueleto y/o aumentando la producción de moco y defensas (Reyes Esparza y Rodríguez Fragosó, 2012). Algunas de estas bacterias se han seleccionado por su capacidad de adherencia a las células epiteliales como *Lactobacillus* spp. (Castro y De Rovetto, 2006).

La adhesina es una de las proteínas de superficie sintetizada por algunas bacterias y permite a éstas reconocer secuencias de carbohidratos presentes en las glicoproteínas o glicolípidos de las células del huésped (Adleberth *et al.*, 2000). La mayoría de cepas de *Lactobacillus plantarum* aisladas del tracto gastrointestinal humano expresan una adhesina de unión a manosa (Adleberth *et al.*, 2000). Otra adhesina muy estudiada es la *mucus-binding protein* de *Lactobacillus reuteri* que juega un papel fundamental en la adaptación de los lactobacilos al hábitat gastrointestinal (Provencio, 2011). En bifidobacterias también se presupone la presencia de adhesinas. Una cepa de *Bifidobacterium adolescentis* 1027, aislada de heces de niños sanos, produce una adhesina que es capaz de disminuir la adhesión de *Escherichia coli* enteropatógena y enteroxigénica, además de *Clostridium difficile* (Iñiguez-Palomares y Acedo-Félix, 2006).

2.2.1.2. Exclusión competitiva de microorganismos patógenos

La exclusión competitiva es el mecanismo más importante del efecto beneficioso que aportan los probióticos al organismo (Adlerbeth *et al.*, 2000; Sánchez 2015). Algunas cepas del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* comparten puntos de unión a carbohidratos con bacterias enteropatógenas, lo que hace posible la competencia entre ellas por los lugares de unión a las células del huésped (Sánchez, 2015). Los mecanismos utilizados por las bacterias probióticas para excluir o reducir el crecimiento de otros microorganismos son múltiples y diversos, entre los que encontramos: la creación de un ambiente hostil, la eliminación de receptores de unión disponibles, la producción y secreción de sustancias antimicrobianas, la competición por los nutrientes esenciales (Bermudez-Brito *et al.*, 2012), la producción de ácidos orgánicos como los ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato, butirato) y lactato y otros productos antimicrobianos como bacteriocinas o peróxido de hidrógeno (Arribas *et al.*, 2008).

2.2.1.3. Producción de sustancias antimicrobianas

Las bacterias probióticas antagonizan bacterias patógenas mediante la reducción del pH luminal, inhibiendo la adherencia y translocación bacteriana y/o produciendo sustancias antibacterianas y defensinas. Otro mecanismo por el cual la microbiota intestinal resiste la colonización por parte de bacterias patógenas es por la producción de un ambiente fisiológicamente restrictivo respecto al pH, potencial redox y por la producción de ácido sulfhídrico (Mbugua y Njenga, 1992; Ng *et al.*, 2008).

a) Ácidos orgánicos: ácido láctico

El primer efecto antimicrobiano ejercido por las bacterias ácido lácticas es debido a la producción de ácido láctico que provoca una disminución del pH del medio, creando un ambiente desfavorable para el desarrollo de muchas bacterias facultativas y anaeróbicas (Fons *et al.*, 2000; Reis *et al.*, 2012; Sánchez, 2015). La acidificación del medio externo produce la acidificación del citoplasma bacteriano. La forma no disociada del ácido, la cual es lipófila, puede difundir pasivamente a través de la membrana de la bacteria y se disocia en el citoplasma (Ammor *et al.*, 2006). La eventual disminución del pH intracelular o la acumulación intracelular de la forma ionizada del ácido orgánico puede llevar a la muerte del patógeno (Bermudez-Brito *et al.*, 2012; Reis *et al.*, 2012). Los ácidos orgánicos, en particular el ácido láctico, tienen un fuerte efecto inhibitorio frente a bacterias Gram negativas y son considerados los principales compuestos antimicrobianos producidos por las bacterias probióticas (Bermudez-Brito *et al.*, 2012).

b) Peróxido de hidrógeno

La producción de H_2O_2 es un importante mecanismo de defensa antimicrobiano (Castro, 2004). Las BAL, en presencia de oxígeno, pueden producir peróxido de hidrógeno como resultado de la acción de las favoproteínas oxidasas o del nicotinamida adenina dinucleótido (NADH). El efecto antimicrobiano del H_2O_2 puede resultar de la oxidación de los grupos sulfidril causando la desnaturalización de varias enzimas, y también de la peroxidación de los lípidos de la membrana celular aumentando así su permeabilidad. Además, el H_2O_2 puede ser un precursor de la producción de radicales libres bactericidas como los radicales superóxido (O_2^-) e hidroxilo (OH^-) que pueden dañar el ADN (Byczkowski y Gessner, 1988; Ammor *et al.*, 2006). El H_2O_2 también podría

actuar como un autoinhibidor, limitando tanto el sobrecrecimiento de la bacteria productora, así como inhibiendo a otros microorganismos (Castro, 2004)

c) Bacteriocinas

Las bacteriocinas son compuestos proteínicos de alto peso molecular (>1000Da), sintetizados por los ribosomas bacterianos que, generalmente, tienen capacidad antimicrobiana contra bacterias estrechamente relacionadas (Fons *et al.*, 2000; Ammor *et al.*, 2006; Reis *et al.*, 2012). La producción de bacteriocinas confiere a las cepas productoras una ventaja competitiva dentro de los entornos microbianos complejos y, como consecuencia, una actividad antimicrobiana asociada. Además, permite el establecimiento y el aumento de la prevalencia de las cepas productoras, así como la inhibición directa del crecimiento de patógenos (O'Shea *et al.*, 2012; Sánchez 2015). Las bacteriocinas actúan sobre la membrana citoplasmática disipando la fuerza motriz de los protones mediante la formación de poros en la bicapa lipídica de los fosfolípidos e inhibiendo la síntesis de la pared celular (Ammor *et al.*, 2006; Bermudez-Brito *et al.*, 2012).

Se han descrito varias bacteriocinas producidas por diferentes especies del género *Lactobacillus*. La actividad inhibitoria de éstas es variable, ya que algunas inhiben otros lactobacilos o bacterias Gram positivas, mientras que otras son activas contra un rango mucho más amplio de bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como mohos y levaduras (Ng *et al.*, 2008). Por ejemplo, la nisina, producida por las BAL, forma un complejo con el último precursor de la pared celular, el lípido II, inhibiendo la biosíntesis de la pared celular de los bacilos formadores de esporas. Posteriormente, este complejo se agrega e incorpora péptidos para formar un poro en la membrana bacteriana (Bermudez-Brito *et al.*, 2012).

2.2.2. Acción sobre el sistema inmunitario

El sistema inmunitario intestinal constituye la parte más extensa y compleja del sistema inmunitario ya que, al estar en contacto con el exterior, recibe diariamente una enorme carga antigénica (Arribas *et al.*, 2008). Las células epiteliales intestinales y las células del sistema inmune innato poseen receptores celulares capaces de discriminar entre la microbiota comensal y la patógena pudiendo inducir tanto mediadores de la respuesta innata como una respuesta adaptativa adecuada. Los probióticos poseen un amplio espectro de efectos inmunomoduladores debido a su capacidad para actuar sobre la inmunidad protegiendo al hospedador frente a infecciones y procesos inflamatorios (Martínez.Cuesta *et al.*, 2012).

Las bacterias, virus, protozoos y hongos inician la respuesta inmunitaria innata, la cual induce la activación de los neutrófilos, monocitos y macrófagos, células dendríticas, células Natural Killer (NK) y sistema de complemento (Neish, 2009). El estudio realizado por Rinne *et al.* (2005) pone de manifiesto la capacidad de los lactobacilos para alertar al sistema inmunológico intestinal y, secundariamente, favorecer el rechazo de microorganismos potencialmente patógenos mediante la producción de inmunoglobulinas de tipo A o por la activación de células NK como afirman Ogawa *et al.* (2006).

Otros efectos inmunomoduladores de los probióticos provienen de su capacidad para incrementar la actividad fagocítica de leucocitos intestinales, promover una mayor proliferación de linfocitos B junto con el aumento de la secreción de inmunoglobulinas A y G y estimular la producción de citoquinas (Ogawa *et al.*, 2006; Arribas *et al.*, 2008). Los lactobacilos y las bifidobacterias probióticas inducen distintas respuesta innatas y perfiles de citoquinas que median una posterior respuesta celular T-helper (Mileti *et al.*, 2009; Schwarser *et al.*, 2013).

2.2.3. Seguridad de las cepas probióticas

En el proceso de selección de microorganismos con capacidad probiótica, se debe tener en consideración diversos aspectos como la seguridad y las características funcionales y tecnológicas de la cepa. En cuanto a la seguridad, se incluyen especificaciones como el origen de la cepa, la ausencia de patogenicidad y las características de resistencia a antibióticos. Referente a los aspectos funcionales se incluyen la viabilidad y la resistencia a las condiciones gastrointestinales, la inmunomodulación y las propiedades antimutagénicas (Saarela *et al.*, 2000; Girmé, 2015).

En la mayoría de los casos, la ausencia de patogenicidad de las cepas se deduce de la aparición de determinada especie de forma natural en los alimentos o como comensal en el intestino humano. Las bacterias del ácido láctico, junto a las bifidobacterias, rara vez se han relacionado con infecciones en humanos (principalmente bacteriemia y miocarditis en pacientes con enfermedad subyacente grave). Los enterococos, en cambio, pueden actuar como patógenos oportunistas en entornos hospitalarios pudiendo provocar endocarditis, bacteriemia e infecciones intraabdominales, urinarias y del sistema nervioso central (Wright, 2005). Otro aspecto importante a determinar es la transmisión de resistencias a los antibióticos. Los probióticos potenciales, no pueden contener genes de resistencia a antibióticos, ni ser capaces de transmitirlos a patógenos humanos o animales. La gran mayoría de las bacterias son resistentes a determinados antibióticos, no obstante, si la resistencia es intrínseca o basada en las peculiaridades fisiológicas o estructurales de la cepa, es muy poco probable que ésta se pueda transferir a organismos sensibles. Un claro ejemplo se encuentra en el caso de la resistencia a la vancomicina inherente en diversos lactobacilos, causada por ciertas peculiaridades estructurales de los peptidoglicanos (Wright, 2005).

2.2.4. Taxonomía de los microorganismos probióticos

Las BAL son los microorganismos utilizados con más frecuencia como probióticos. Aun así, existen otros grupos de bacterias y hongos considerados probióticos. En la Tabla 1 se indican los microorganismos más utilizados como probióticos en el hombre y los animales:

Tabla 1. Principales microorganismos utilizados como probióticos en humanos y animales (adaptación de Caja *et al.*, 2003).

Microorganismos	Géneros	Especies
Bacterias lácticas no esporuladas	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. cellobiosus</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. fermentum</i> , , <i>L. plantarum</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. rhamnosus</i> .
	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. infantus</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. thermophilus</i>
	<i>Streptococcus</i>	<i>S. cremoris</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. lactis</i> , <i>S. leuconostoc</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. thermophilus</i>
	<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>
	<i>Lactococcus</i>	<i>L. lactis</i>
	<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidolactici</i>
	<i>Leuconostoc</i>	<i>L. mesenteroides</i>
Bacterias lácticas esporuladas	<i>Sporolactobacillus</i>	<i>S. inulinus</i>
Bacterias no lácticas esporuladas	<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i> , <i>B. clausii</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. subtilis</i>
Bacterias no lácticas no esporuladas	<i>Propionobacterium</i>	<i>P. freudenreichii</i>
Levaduras	<i>Saccharomyces</i>	<i>S. boulardii</i> , <i>S. cerevisiae</i>
Hongos filamentosos	<i>Aspergillus</i>	<i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i>

En perros sanos se han aislado bacterias lácticas no esporuladas con potencial probiótico pertenecientes al género *Lactobacillus*. *Lactobacillus fermentum*, *L. salivarius*, *L. rhamnosus*, *L. pentosus* y *L. mucosae*. También se han aislado bacterias pertenecientes al género *Enterococcus* como por ejemplo *E. faecium* y del género *Bifidobacterium* como *Bifidobacterium lactis* (Wynn, 2009).

2.2.5. Uso de probióticos para la prevención de enfermedades

Los beneficios que aportan los probióticos a los animales sanos pueden manifestarse desde un aumento del apetito y una mejora en la consistencia y olor fecal (Hasiri *et al.*, 2015; Jugan *et al.*, 2017) a un incremento de la modulación de la respuesta inmunológica ayudando a la prevención contra futuras infecciones. Cabe destacar que en los estudios no se observan efectos negativos en los animales sanos lo que demuestra que la administración de cepas probióticas es relativamente segura (Jugan *et al.*, 2017).

Los estudios sobre el uso de probióticos en la prevención de enfermedades genitourinarias son numerosos en medicina humana. Los lactobacilos son los microorganismos predominantes en la microbiota del tracto vaginal de una mujer sana (Santos *et al.*, 2016), especialmente las especies *L. crispatus*, *L. jensenii*, *L. iners* y *Lactobacillus gasseri* (Falagas *et al.*, 2007; Mastromarino *et al.*, 2013) seguidos de *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. vaginalis*, *L. delbrueckii*, *L. salivarius*, *L. reuteri* y *L. rhamnosus* (Cribby *et al.*, 2008). Cualquier factor que pueda alterar el equilibrio de esta microbiota vaginal afecta a la mujer y la hace propensa a infecciones bacterianas y/o fúngicas como pueden ser la vaginosis o la candidiasis vulvovaginal, respectivamente (Senok *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2016). En una vaginosis bacteriana la microbiota vaginal, dominada por el género *Lactobacillus*, se ve desplazada por microorganismos anaeróbicos (Ya *et al.*, 2010; Mastromarino *et al.*, 2013). En condiciones normales, el género *Lactobacillus* previene el sobrecrecimiento de bacterias con potencial patógeno mediante mecanismos de inmunomodulación, producción de sustancias antimicrobianas, competición por nutrientes, inhibición de la adhesión a receptores epiteliales y producción de biofilms y/o coagregación (Senok *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2016).

Los tratamientos más comunes para la vaginosis bacteriana como el metronizadol oral o vaginal o la clindamicina vaginal tienen una efectividad de menos del 52% con una recurrencia superior al 50% dentro de un período de 6-

12 meses (Ya *et al.*, 2010). Por estas razones, las cepas de *Lactobacillus* spp., pueden ser una herramienta efectiva para la prevención de infecciones vaginales en clínica humana (Santos *et al.*, 2016). En el estudio de Aslim y Kilic (2006) se aislaron 58 cepas de *Lactobacillus* spp. de 10 mujeres y se evaluó la producción de H₂O₂ y ácido láctico así como la actividad inhibitoria frente a bacterias patógenas. Solo en 10 cepas de las aisladas, entre las que destacaron especies como *Lactobacillus gasseri*, *L. acidophilus*, *L. vaginalis*, *L. crispatus*, *L. plantarum* y *L. brevis*, presentaron una buena capacidad probiótica, haciéndolas candidatas para su uso clínico.

A nivel genitourinario el estudio de Murphy *et al.*, (2009) demostró como especies de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* aislados de perros y gatos tenían la capacidad de degradar el oxalato en condiciones *in vitro* y podían reducir la excreción de oxalato en orina *in vivo* en modelos de ratas. Siendo las cepas *Lactobacillus animalis* 223C (de origen felino) y *Lactobacillus animalis* 5323 (de origen canino) las que mostraron una mayor capacidad metabólica de oxalato en los ensayos con ratas.

Sánchez (2015) comprobó que la suplementación oral con *Lactobacillus reuteri* CECT7266 y *Lactobacillus fermentum* CECT7265 en perras reproductoras durante 3 meses, aumentó la fertilidad y el número de cachorros por hembra gestante en el grupo suplementado, detectándose el *L. fermentum* CECT7265 en la vagina. Así mismo, la suplementación oral con los citados lactobacilos en hembras gestantes durante el mes previo al parto, permitió identificar la presencia de *L. reuteri* CECT7266 en la leche y el meconio de los cachorros.

En los estudios realizados por Marsella (2009) y Marsella *et al.* (2013) se evaluó la capacidad probiótica de *Lactobacillus rhamnosus* GG en cachorros sensibilizados con *Dermatophagoides farinae* causante de la dermatitis atópica (Jugan *et al.*, 2017). Se comprobó que, a pesar de que se manifestara la enfermedad en los cachorros a los que se les había administrado el probiótico, esta mostró reacciones más leves en las pruebas cutáneas intradérmicas y títulos de IgE más bajos en comparación con el grupo control (Jugan *et al.*, 2017). En otro estudio de Marsella (2012) se evaluó el mismo probiótico en

perros de entre 3-4 años de edad y se observó una reducción de los signos clínicos de la dermatitis atópica en comparación con el grupo control (Jugan *et al.*, 2017).

Los probióticos también pueden ser utilizados para fortalecer el desarrollo y salud de los cachorros. En la tesis doctoral de Weiss (2003) se demostró que la administración de *Enterococcus faecium* SF68 en cachorros de Beagle estimula e incrementa la respuesta inmunológica, además de mostrar altos niveles de IgA. Así mismo, obtuvo recuentos de lactobacilos mucho más altos y un descenso en la concentración de *Escherichia coli* y una reducción del número de cachorros en los que se aislaban *Clostridium perfringens*. Esta reducción en la concentración de especies de clostrídios gracias a la administración de *E. faecalis* SF68 también fue observada por Vahjen y Männer (2003).

La suplementación oral con *Lactobacillus reuteri* CECT7266 y *Lactobacillus fermentum* CECT7265 durante 4 semanas, modificó la microbiota intestinal de cachorros con un aumento de los lactobacilos y la reducción de las enterobacterias excretadas en heces (Sánchez, 2015).

La mayoría de los estudios sobre el uso de probióticos en perros se basan en patologías intestinales. La diarrea es una enfermedad común y puede estar provocada por desequilibrios en la microbiota natural en respuesta a un estrés externo (Bybee *et al.*, 2011; Gómez-Gallego *et al.*, 2016), a la ingestión de alimentos en mal estado o no aptos para el animal, a cambios abruptos en la dieta, hipersensibilidad, intolerancia alimentaria o patógenos como *E. coli*, *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., *C. perfringens* enterotoxigénico y *C. difficile* toxigénico (Kelley *et al.*, 2009; Suchodolski *et al.*, 2012; Gómez-Gallego *et al.*, 2016).

Gómez-Gallego *et al.*, (2016) evaluaron la administración de leche agria con tres cepas de *Lactobacillus* con potencial probiótico (*L. fermentum* VET9A, *L. rhamnosus* VET16A y *L. plantarum* VET14A) en perros diagnosticados con diarrea aguda. Se demostró que este conjunto de bacterias tenía un efecto normalizador en la consistencia de las heces así como una mejora en la salud del animal manteniendo el apetito y reduciendo el vómito. Además, se observó una reducción de *Clostridium perfringens* productoras de alfa-toxinas y *Enterococcus faecium*, bacterias que típicamente se encuentran involucradas en procesos diarreicos.

Gagné *et al.* (2013) evaluaron la administración de un simbiótico compuesto por *Enterococcus faecium* SF68, *Bacillus coagulans*, *L. acidophilus*, vitamina B, fructooligosacáridos y manano-oligosacáridos en perros de trineo con diarrea inducida por el ejercicio. Se observó una mejoría clínica más rápida en el grupo tratado (5 días) comparado con el grupo control (7 días) (Jugan *et al.*, 2017). Kelley *et al.* (2012) observaron que la administración de *Bifidobacterium animalis* AHC7 en perros antes y durante el alojamiento en perreras disminuía los episodios diarreicos inducidos por estrés. También comprobaron que el aumento de la dosis de *B. animalis* AHC7 junto con la administración de metronidazol, reducía la duración de los signos clínicos en perros con diarrea idiopática aguda a unos 3,9 días en comparación con los 6,6 días en los perros control. Otras cepas evaluadas fueron *Lactobacillus acidophilus* NCC2628, *L. acidophilus* NCC2766 y *L. johnsonii* NCC2767. Los perros que se alimentaron con este conjuntos de cepas mejoraron los signos clínicos de diarrea con mayor rapidez que los perros control (Sauter *et al.*, 2006; Bowles, 2013).

Para perros con diarrea inducida por antimicrobianos se ha observado que la administración de levaduras como *Saccharomyces boulardii* una vez aparecida la diarrea disminuye la duración de los signos clínicos a unos 2,9 días en comparación a los 6,5 días de los perros del grupo control (Aktas *et al.*, 2007; Jugan *et al.*, 2017).

O'Mahony *et al.* (2009) llevaron a cabo un aislamiento e identificación de cepas con potencial probiótico a partir de secciones gastrointestinales obtenidos de 7 cadáveres de perros. De las cepas identificadas, la candidata probiótica fue *Bifidobacterium animalis* AHC7 que tuvo la capacidad de reducir las concentraciones de *Clostridium* spp. y *Clostridium difficile*.

Objetivos y Plan de Trabajo

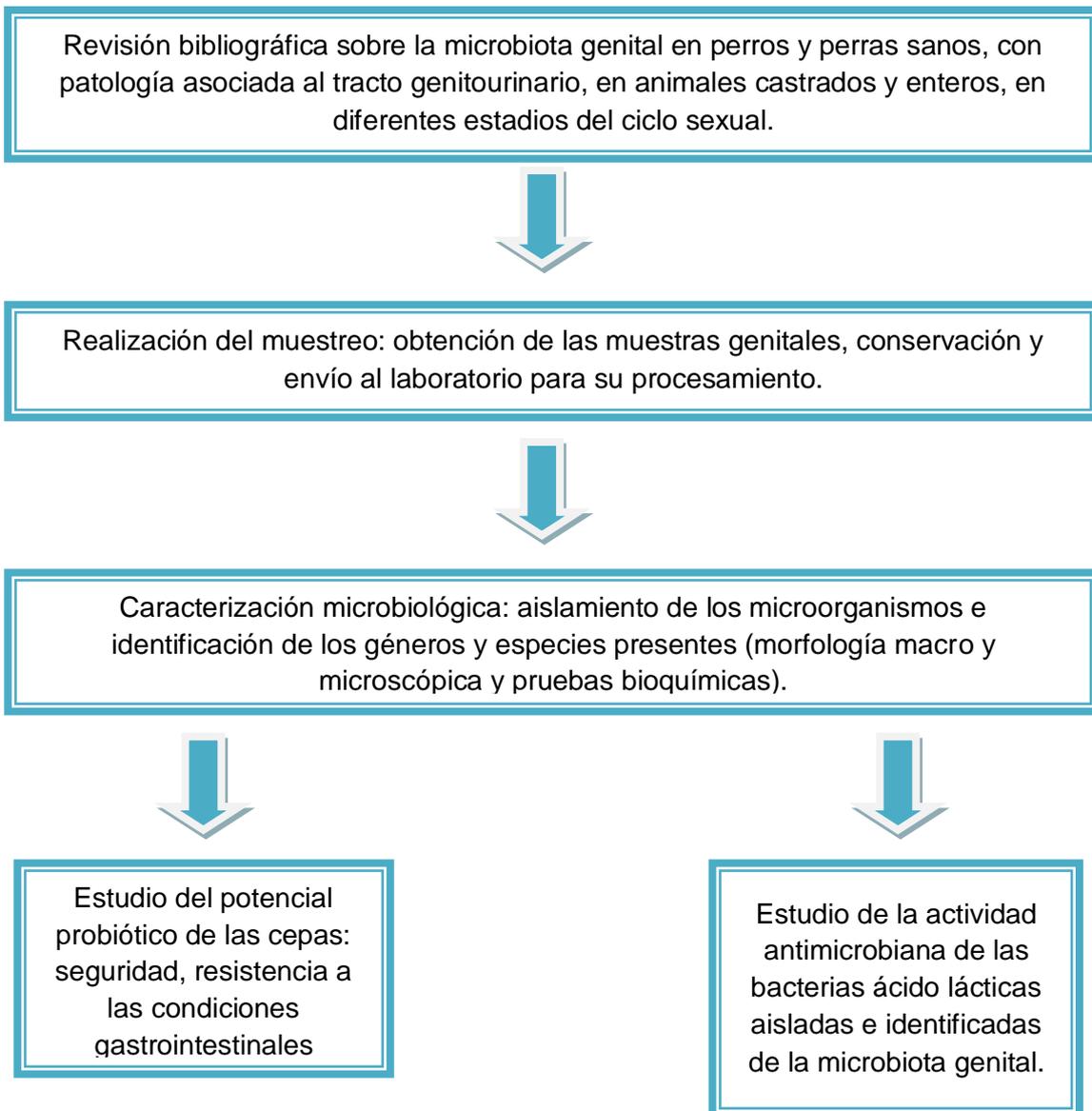
1. Objetivos

Los objetivos de la presente Tesis doctoral son los siguientes:

1. Aislar y caracterizar los diferentes microorganismos de muestras genitales de perros y perras sanos y, esterilizados en un período no inferior a dos meses. Los animales proceden de 3 núcleos zoológicos distintos con el objeto de determinar diferencias relacionadas con la localización geográfica y el diferente manejo.
2. Aislar y caracterizar los microorganismos presentes en muestras vaginales y prepuciales de perras y perros no castrados que acudieron a la *Fundació Hospital Clínic Veterinari* de la UAB por diferentes motivos reproductivos.
3. Aislar cepas de los diferentes géneros pertenecientes al grupo de bacterias ácido lácticas a partir de todas las muestras de machos y hembras analizadas.
4. Evaluar y seleccionar las cepas de bacterias ácido lácticas con actividad probiótica y evaluar su actividad antimicrobiana.

2. Plan de trabajo

El plan de trabajo desarrollado se resume de forma esquemática a continuación:



Material y Métodos

1. Animales y técnica de muestreo

1.1. Origen y obtención de las muestras

1.1.1 Origen de los animales de los bloques experimentales

En el primer bloque experimental, las muestras se obtuvieron de perros de tres núcleos zoológicos diferentes. Se analizaron un total de 50 perros (*Canis familiaris*), 25 machos y 25 hembras. Diez de las muestras (3 machos y 7 hembras) procedieron del Núcleo Zoológico 1, 23 muestras (14 hembras y 9 machos) del Núcleo Zoológico 2 y, por último, 17 muestras (8 hembras y 9 machos) procedieron del Núcleo Zoológico 3.

Los criterios de inclusión fueron (1) presentar un buen estado sanitario, (2) haber sido castrado o esterilizado en un período no inferior a 2 meses y (3) ser un animal adulto. Para determinar el estado de salud, se realizó una anamnesis y una exploración clínica antes de incluirlos en el estudio. No se tuvo en cuenta la raza como factor de inclusión.

En el segundo bloque experimental se analizaron muestras vaginales de perras que acudieron a la consulta del Servicio de Reproducción de la *Fundació Hospital Clínic Veterinari* de la *Universitat Autònoma de Barcelona*.

Se analizaron 80 muestras procedentes de hembras, todas ellas no castradas en el momento de la obtención de la muestra. Se incluyeron hembras de 21 razas diferentes y hembras mestizas, de entre 7 meses y 10 años de edad. Las pacientes se sometieron a una anamnesis y a una evaluación clínica que incluía también la determinación de la fase del ciclo sexual en la que se encontraban mediante citología vaginal y la determinación de los niveles séricos de progesterona, en caso necesario. En el estudio también se incluyeron 5 muestras procedentes de machos sin castrar. Los pacientes, del

mismo modo que se hizo con las hembras, se sometieron a una anamnesis y a una evaluación clínica.

Los animales se agruparon en cuatro grupos diferentes: Con Signos Clínicos Reproductivos (CSCR), Hembras en Celo (HC), Otros Controles Reproductivos (OCR) y Machos del Hospital Clínico Veterinario (MHCV).

En el grupo CSCR se incluyeron 23 perras con alguna patología del sistema genitourinario. Estuvo formado por perras con vaginitis ($n= 18$), piometra ($n= 2$), vulvitis ($n= 2$) y masa uterina ($n= 1$).

El grupo HC estuvo formado por 48 perras que acudieron a la consulta del Servicio de Reproducción del hospital para someterse a una inseminación artificial.

En el grupo OCR se incluyeron 9 perras que acudieron a la consulta del Servicio de Reproducción del hospital para diagnóstico de gestación, revisión de cesárea y ecografías, entre otras.

Por último, el grupo MHCV estuvo formado por 5 perros sanos, no castrados, que acudieron a la consulta para un control reproductivo.

1.1.2. Obtención de muestras

Para la obtención de muestras vaginales y prepuciales se utilizaron hisopos estériles con medio de transporte (Hisopo estéril recolector de muestras Eurotubo[®] con medio de transporte STUART, Deltalab, Rubí, España).

Previamente al muestreo, tanto la vulva como el prepucio se desinfectaron con gasas humedecidas en alcohol etílico al 96^o (Acofarma, Terrassa, España) para eliminar la contaminación por microorganismos ambientales o fecales. En la hembra se introdujo el hisopo por la comisura dorsal de la vulva evitando el contacto con los labios, una vez en la vagina se rotó para recoger muestra por

toda el área del hisopo y se extrajo de igual manera (Figura 1) (<http://www.vetpraxis.net>).

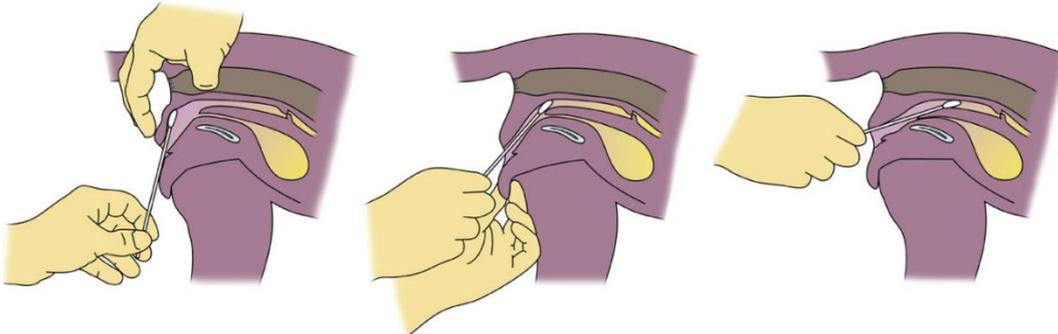


Figura 1. Secuencia del correcto muestreo de la vagina en las perras (<http://www.vetpraxis.net>)

En el caso de los machos, se desinfectó el orificio prepucial mediante gasas humedecidas con alcohol (Acofarma, Terrassa, España), se abrió la obertura para permitir el paso del hisopo (Deltalab, Rubí, España) y se introdujo lentamente hasta el fondo, donde el hisopo se rotó y se retiró.

Los hisopos se colocaron inmediatamente en el medio de transporte y se transportaron al laboratorio a temperatura ambiente. Éstos se mantuvieron a 4°C durante un máximo de 24 horas hasta la realización del análisis microbiológico.

2. Técnicas de aislamiento e identificación microbiana

2.1. Procesado de las muestras

En todas las muestras obtenidas se aplicaron los protocolos establecidos por el *Grup de Recerca en Microbiologia Aplicada i Medi Ambiental* del *Departament de Sanitat i Anatomia Animals de la Facultat de Veterinària (Universitat Autònoma de Barcelona)*.

a) Siembra e incubación de las placas

Los medios de cultivo utilizados se seleccionaron con el fin de aislar la máxima diversidad de especies microbianas presentes en las muestras vaginales y prepuciales. Dichos medios se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Resumen de los medios, condiciones de incubación y microorganismos valorados en el estudio.

Medio de cultivo	Condiciones de respiración	T ^a	Tiempo	Microorganismos detectables
Columbia Agar Sangre	Aerobiosis	37°C ± 1°C	24h ± 2h	Aerobios y anaerobios mesófilos
	Anaerobiosis	37°C ± 1°C	48h ± 2h	
Tryptona Soja Agar	Aerobiosis	37°C ± 1°C	24h ± 2h	Aerobios y anaerobios mesófilos
	Anaerobiosis	37°C ± 1°C	48h ± 2h	
ManRogosaSharpe Agar	Aerobiosis	37°C ± 1°C	24h ± 2h	Bacterias ácido lácticas
	Anaerobiosis	37°C ± 1°C	48h ± 2h	
	Microaerofilia 5% CO ₂	37°C ± 1°C	24h ± 2h	
Baird Parker Agar	Aerobiosis	37°C ± 1°C	24h ± 2h	<i>Staphylococcus aureus</i>
MacConkey Agar	Aerobiosis	37°C ± 1°C 42°C ± 1°C	24h ± 2h	Enterobacterias totales, coliformes, <i>E. coli</i> , Enterobacterias de origen fecal.
Sabouraud + cloramfenicol	Aerobiosis	28°C ± 1°C	48h ± 2h	Levaduras y hongos miceliares
Eosine-Methylene Blue agar	Aerobiosis	37°C ± 1°C	24h ± 2h	<i>E. coli</i>
		42°C ± 1°C	24h ± 2h	

La siembra se realizó utilizando la técnica de zigzag por agotamiento. A continuación, se procedió a la incubación de las placas sembradas. Las placas incubadas en aerobiosis se mantuvieron en las estufas durante 24 horas \pm 2 horas. En el caso de las placas incubadas en anaerobiosis, la atmósfera anaeróbica se obtuvo mediante AnaerocultA[®] (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y se incubaron durante 48 horas \pm 2 horas. Por último, las placas de agar Sabouraud se incubaron a lo largo de 7 días en condiciones de aerobiosis y a 28°C.

b) Aislamiento de las colonias

Finalizado el tiempo de incubación, se procedió al recuento y al aislamiento de las colonias presentes en cada uno de los medios, utilizando la técnica de siembra por agotamiento (Imagen 1) con la ayuda de un asa de Kolle.

Una vez aisladas las colonias, se procedió a la descripción de las características morfológicas básicas de cada una de las cepas para su posterior identificación.

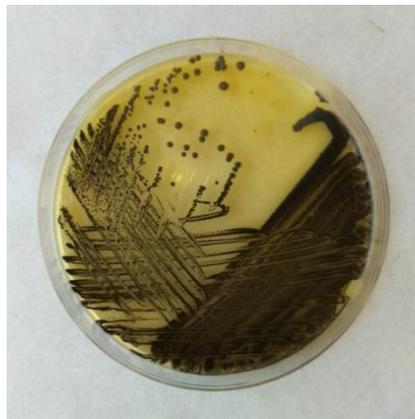


Imagen 1. Siembra por agotamiento de *S. aureus* en agar Baird Parker

2.2. Identificación microbiana

2.2.1. Características macroscópicas y microscópicas

Se realizó una descripción macroscópica de cada una de las colonias aisladas siguiendo las características diferenciales detalladas en la Tabla 3.

Tabla 3. Principales características morfológicas macroscópicas de las colonias bacterianas (Adaptación de Granados y Villaverde, 2003).

Forma	Circular, puntiforme, irregular, alargada, fusiforme, filamentosa, rizoide.
Superficie	Rugosa, lisa, cerebriforme, en anilla, concéntrica.
Elevación	Elevada, aplanada, pulvinada, convexa, umbonada, umbilicada.
Tamaño	Estimación del diámetro de la colonia.
Contorno	Continua, ondulada, festoneada, ondulada, erosionada.
Color	Blanca, gris, naranja, amarilla.
Opacidad	Transparente, opaca.
Estructura interna	Amorfa o granulosa.
Consistencia	Dura, viscosa, membranosa, gelatinosa, mucosa.

Las características microscópicas de cada una de las colonias aisladas se describieron utilizando las técnicas descritas a continuación.

a) Tinción de Gram

Esta tinción permite dividir a las bacterias en Gram negativas y positivas según las diferencias significativas de la naturaleza física de la pared celular.

En primer lugar, se realizó un frotis con la cepa a visualizaren un portaobjetos. A continuación, el frotis se tiñó con cristal violeta de genciana (Panreac Química S.A., España). Seguidamente, se lavó con agua destilada y se trató con lugol (Panreac Química S.A., España) que actuó como mordiente. A continuación, se decoloró el frotis mediante alcohol acetona (Panreac Química

S.A., España). Finalmente, se tiñó con safranina (Panreac Química S.A., España), se lavó con agua destilada y se procedió a su visualización al microscopio (Prescott *et al.*, 2004).

Al visualizar la tinción de Gram al microscopio, se evaluó la coloración de los microorganismos, siendo Gram negativos los teñidos de color rosáceo y Gram positivo los de color violeta, tal como se observa en las Imágenes 2 y 3.

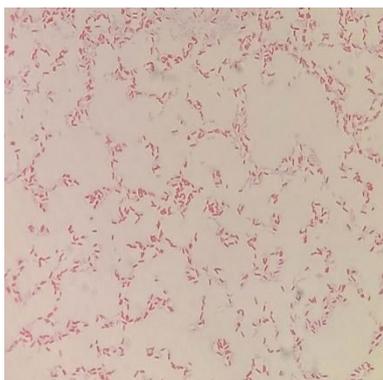


Imagen 2. Bacilos Gram negativos.

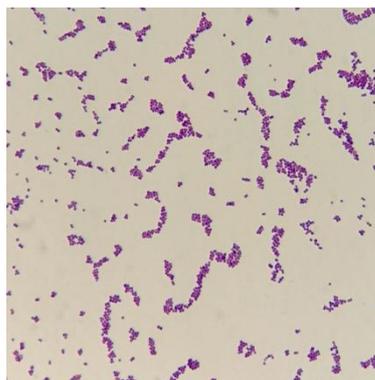


Imagen 3. Cocos Gram positivos.

b) Tinción de esporas

La tinción de esporas, descrita por Vázquez *et al.* (2011), permite poner de manifiesto la endospora bacteriana, una forma de resistencia producida por algunos géneros de bacterias Gram positivas. La endospora, debido a las características de sus envueltas, no se tiñe con procedimientos habituales como podría ser una tinción simple o una tinción de Gram. El método más utilizado es el de *Schaeffer Fulton* (Vázquez *et al.*, 2011).

En primer lugar, se realizó un frotis de la colonia y se tiñó con verde de malaquita (Panreac Química S.A., España). A continuación, se le aplicó calor con el fin de modificar la permeabilidad de la endospora y permitir así la entrada del verde de malaquita a través de las capas externas de la endospora (Imagen 4).

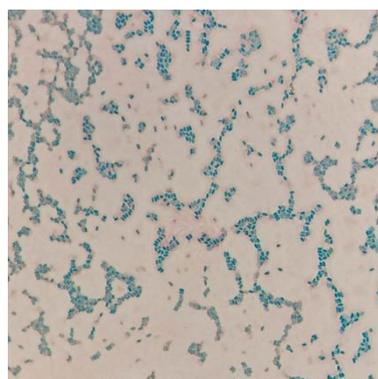


Imagen 4. Tinción de esporas

Después, se lavó con agua destilada y se tiñó con safranina (Panreac Química S.A., España). Por último, se lavó con agua destilada y se observó al microscopio (Vázquez *et al.*, 2011).

c) Tinción de levaduras

Para la observación microscópica de levaduras se utilizó la tinción simple con azul de metileno, descrita por Painting y Kirsop (1990), que permite tanto la observación de la morfología de la levadura como la diferenciación entre vivas y muertas (Imagen 5).

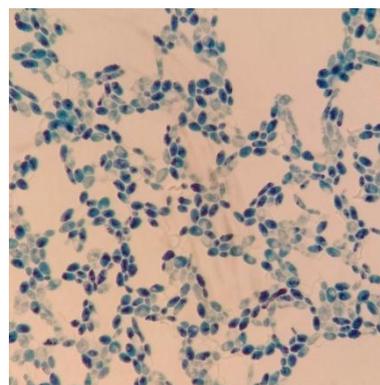


Imagen 5. Tinción de levaduras con azul de metileno.

Inicialmente, se realizó un frotis con la levadura a visualizar. Se tiñó con el colorante azul de metileno (Panreac Química S.A., España), se lavó con agua destilada y se visualizó al microscopio. Las levaduras teñidas de azul indicaron la inviabilidad de los propios microorganismos (Painting y Kirsop, 1990).

d) Observación de hongos miceliales

Para la observación de los hongos miceliales se utilizó una solución que preserve la integridad de las estructuras fúngicas como es el azul de lactofenol (Panreac Química S.A., España). El contraste con azul de lactofenol, descrita por López-Jácome *et al.* (2014), no se considera una tinción diferencial. Sin embargo, posee características tintoriales que permiten observar cada uno de los componentes fúngicos y apreciar fácilmente las estructuras para una adecuada identificación (Imagen 6).

Sobre un portaobjetos se depositó una sección de la zona más madura del hongo a visualizar. A continuación, se le añadió una gota de azul de lactofenol (Panreac Química S.A., España) y se cubrió mediante un cubreobjetos.

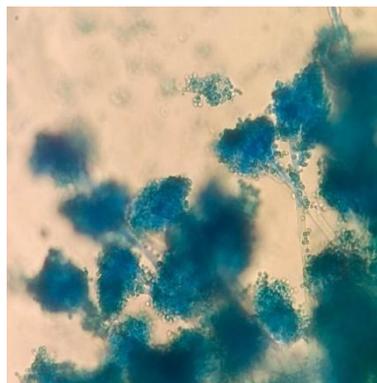


Imagen 6. Contraste con azul de lactofeno de *Penicillium* spp.

2.2.2. Pruebas bioquímicas básicas y galerías miniaturizadas

Las pruebas bioquímicas permiten determinar las características metabólicas de las bacterias. Al evaluar la presencia de enzimas, algunas de estas pruebas son técnicas rápidas y su lectura varía entre unos segundos hasta unas pocas horas. Otras pruebas bioquímicas requieren para su lectura el crecimiento microbiológico con previa incubación de 18 a 48 horas. A este grupo pertenecen la mayoría de las pruebas que detectan componentes metabólicos (Fernández Olmos *et al.*, 2010).

a) Prueba de la catalasa

La prueba de la catalasa, descrita por Fernández Olmos *et al.* (2010), permite la detección de las bacterias que sintetizan catalasa al hidrolizar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso liberándose en forma de burbujas, como se muestra en la siguiente reacción:



El principal objetivo de esta prueba fue la de separar el género *Staphylococcus* del género *Streptococcus* (Fernández Olmos *et al.*, 2010).

Sobre un portaobjetos limpio se depositó una porción de la colonia a ensayar. A continuación, se añadió una gota de peróxido de hidrógeno al 10% (Panreac Química S.A., España) por encima de la colonia y se visualizó la posible producción de oxígeno. En el caso de observar la producción de burbujas se consideró como un resultado positivo (MacFaddin, 2003).

b) Prueba de la oxidasa

Esta prueba bioquímica, descrita por Fernández Olmos *et al.* (2010), permite la determinación de la presencia o ausencia del citocromo C. Además, indica con probabilidad el tipo de Gram debido a que la mayoría de bacterias Gram positivas son oxidasas negativas y ayuda a la diferenciación de géneros como *Acinetobacter* o *Pseudomonas* (MacFaddin, 2003).

Sobre un papel de filtro limpio se depositó una porción de la colonia a ensayar. A continuación, se le añadió una gota del reactivo Oxidasa (BioMérieux S.A., Francia) y se realizó una estría sobre el papel de filtro. En el caso de observar un cambio de color a azul-violeta se consideró como un resultado positivo (MacFaddin, 2003).

c) Actividad hemolítica

Algunas bacterias poseen la capacidad de lisar la membrana de eritrocitos y producir la liberación de la hemoglobina mediante la producción de hemolisinas, la presencia de antígenos somáticos y/o de flagelos. A través de la observación de la actividad hemolítica se determinó la capacidad patógena de la cepa. Debido al efecto negativo que los estreptococos β -hemolíticos pueden ejercer sobre los cachorros neonatos, se consideró muy importante la determinación de estos, ya que una parte relevante de las muestras proceden de perras en celo que se inseminaron artificialmente.

Para la observación de la actividad hemolítica de las cepas bacterianas se sembraron en agar Columbia + 5% de sangre de cordero (Bio-Rad Laboratories, USA). Las cepas sembradas se incubaron durante 24 ± 2 horas a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ en las condiciones de respiración correspondiente a la cepa (aerobiosis, anaerobiosis o microaerofilia). Finalizado el tiempo de incubación, se observó el crecimiento bacteriano el cual pudo manifestar de tres tipos de hemólisis diferentes: α -hemólisis o parcial, β -hemólisis o completa y γ -hemólisis o no hemólisis.

Las bacterias α -hemolíticas o parciales se caracterizaron por una lisis parcial de los eritrocitos alrededor de las colonias produciendo un cambio de color gris verdoso en el medio de cultivo. Las bacterias β -hemolíticas o completas se caracterizaron por una lisis completa de los eritrocitos produciendo una eliminación de la sangre en el medio alrededor de la colonia. Por último, las γ -hemolíticas o no hemolíticas se caracterizaron por no producir la lisis de los eritrocitos y, por ende, no producir cambios en el medio debajo de las colonias y a su alrededor (Koneman y Allen, 2008).

d) Galerías miniaturizadas

En el mercado existen numerosos sistemas rápidos que permiten la identificación de microorganismos a través de la realización de múltiples pruebas bioquímicas, entre las que se encuentran las llamadas galerías miniaturizadas. Para llevar a cabo las identificaciones a nivel de especies de las bacterias aisladas de la microbiota genital de los animales, se utilizaron los sistemas miniaturizados API[®] (BioMérieux S.A., Francia) basados en microtubos aislados con substratos liofilizados individuales que permiten realizar simultáneamente entre 10 y 50 pruebas bioquímicas (Fernández Olmos *et al.*, 2010). La metodología y material utilizado se encuentra detallado en los manuales de instrucciones específicos para cada API[®] facilitados por la casa comercial BioMérieux S.A., Francia. Los sistemas miniaturizados que se utilizaron en esta tesis doctoral se detallan a continuación:

Kit API[®] 20 E

API[®] 20 E es un sistema estandarizado que permite la identificación de *Enterobacteriaceae* y otros bacilos Gram negativos no exigentes. La galería del sistema API[®] 20 E está formado por 20 microtubos con sustratos deshidratados que se inoculan con la suspensión bacteriana a ensayar. Las reacciones producidas durante el periodo de incubación se traducen en cambios de color espontáneos o por la adición de reactivos (Imagen 7).

Material y Métodos



Imagen 7. Perfil negativo (arriba) y perfil positivo (abajo) de las pruebas bioquímicas del API® 20 E (<http://apiweb.biomerieux.com>)

Las lecturas de las reacciones se llevaron a cabo utilizando la Tabla de Lectura (Tabla 4), mientras que la identificación se obtuvo con la ayuda del Catálogo Analítico o el programa informático de identificación.

Tabla 4. Tabla de lectura de las reacciones de las pruebas del API® 20 E.

Tests	Reacción-Enzimas	Resultado Negativo	Resultado Positivo
ONPG	β -galactosidasa	Incoloro	Amarillo
ADH	Arginina-dihidrolasa	Amarillo	Rojo-anaranjado
LDC	Lisina descarboxilasa	Amarillo	Rojo-anaranjado
ODC	Ornitinadescarboxilasa	Amarillo	Rojo-anaranjado
CIT	Utilización del citrato	Verde pálido - amarillo	azul-verde - azul
H ₂ S	Producción de H ₂ S	Incoloro-grisáceo	Depósito negro
URE	Ureasa	Amarillo	Rojo-anaranjado
TDA	Triptofanodesaminasa	Amarillo	Marrón-rojizo
IND	Producción de indol	Incoloro - verde	Rosa
VP	Producción de acetoína	Incoloro - rosa pálido	Rosa - rojo
GEL	Gelatinasa	Sin difusión	Difusión pigmento negro
GLU	Fermentación-oxidación de la glucosa	Azul - azul verdoso	Amarillo
MAN	Fermentación-oxidación de manitol	Azul - azul verdoso	Amarillo
INO	Fermentación-oxidación de inositol	Azul - azul verdoso	Amarillo
SOR	Fermentación-oxidación de sorbitol	Azul - azul verdoso	Amarillo
RHA	Fermentación-oxidación de ramnosa	Azul - azul verdoso	Amarillo
SAC	Fermentación-oxidación de sacarosa	Azul - azul verdoso	Amarillo
MEL	Fermentación-oxidación de melobiosa	Azul - azul verdoso	Amarillo
AMY	Fermentación-oxidación de amígdalina	Azul - azul verdoso	Amarillo
ARA	Fermentación-oxidación de arabinosa	Azul - azul verdoso	Amarillo
OX*	Citocromo oxidasa	Incoloro	Azul

*La prueba de la citocromo oxidasa es una prueba complementaria al test API 20E.

Kit API[®] 20 NE

API[®] 20 NE es un sistema estandarizado para la identificación de los bacilos Gram negativos no enterobacterias y no fastidiosos, por ejemplo: *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Flavobacterium* spp., *Moraxella* spp., *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp. etc., que combinan 8 ensayos convencionales, 12 ensayos de asimilación y una base de datos. La galería API[®] 20 NE incluye 20 microtubos que contienen sustratos deshidratados. Los ensayos convencionales se inoculan con una suspensión bacteriana salina los cuales tienen la capacidad de producir reacciones que se traducen en cambios de color, bien espontáneos o bien provocados mediante la adición de reactivos. Sin embargo, en los ensayos de asimilación se inoculan con un medio mínimo y las bacterias crecen solamente si son capaces de utilizar el correspondiente sustrato (<http://apiweb.biomerieux.com>).

La lectura de la galería se llevó a cabo con la ayuda de la Tabla de identificación (Tabla 5) y la identificación se realizó mediante el Software de Identificación.

Tabla 5. Tabla de identificación de las reacciones de las pruebas del API®20 NE.

Tests	Reacciones-Enzimas	Resultado Negativo	Resultado Positivo
NO₃	Reducción de nitratos a nitritos	Incoloro	Rosa-Rojo
	Reducción de nitratos a nitrógeno	Rosa	Incoloro
TRP	Formación de indol	Incoloro-verde pálido / amarillo	Rosa
GLU	Fermentación de la glucosa	Azul a verde	Amarillo
ADH	Arginina dihidrolasa	Amarillo	Naranja / Rosa / Rojo
URE	Ureasa	Amarillo	Naranja / Rosa / Rojo
ESC	Hidrólisis (β-glucosidasa)	Amarillo	Gris / Marrón / Negro
GEL	Hidrólisis (proteasa)	Sin difusión del pigmento	Difusión del pigmento negro
PNPG	β-galactosidasa	Incoloro	Amarillo
GLU	Asimilación de la glucosa	Transparencia	Turbio
ARA	Asimilación de la arabinosa	Transparencia	Turbio
MNE	Asimilación de la manosa	Transparencia	Turbio
MAN	Asimilación del manitol	Transparencia	Turbio
NAG	Asimilación del N-acetil-glucosamina	Transparencia	Turbio
MAL	Asimilación de la maltosa	Transparencia	Turbio
GNT	Asimilación del gluconato potásico	Transparencia	Turbio
CAP	Asimilación del ácido caprico	Transparencia	Turbio
ADI	Asimilación del ácido adipico	Transparencia	Turbio
MLT	Asimilación de la malata	Transparencia	Turbio
CIT	Asimilación del citrato trisódico	Transparencia	Turbio
PAC	Asimilación del ácido fenilacético	Transparencia	Turbio
OX	Citocromo-oxidasa	Incoloro	Azul

Kit API® 20 Staph

API® 20 Staph es un sistema estandarizado de identificación de los géneros *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Kocuria* que incluye tests bioquímicos estandarizados y miniaturizados, y una base de datos específica. La galería API® 20 Staph incluye 20 microtubos que contienen sustratos deshidratados a los que se inocula la suspensión bacteriana a ensayar. Las reacciones que se producen durante la incubación se traducen en cambios de color, bien espontáneos o bien provocados mediante la adición de reactivos (<http://apiweb.biomerieux.com>).

La lectura de estas reacciones se realizó con la ayuda de la Tabla de Lectura (Tabla 6) y la identificación se obtuvo mediante el Software de Identificación.

Tabla 6. Tabla de identificación de las reacciones de las pruebas del API® 20 Staph.

Tests	Reacciones-Enzimas	Resultado Negativo	Resultado Positivo
0	Control negativo	Rojo	-
GLU	Acidificación de la D-glucosa (Control positivo)	Rojo	Amarillo
FRU	Acidificación de la D-fructosa	Rojo	Amarillo
MNE	Acidificación de la D-manosa	Rojo	Amarillo
MAL	Acidificación de la maltosa	Rojo	Amarillo
LAC	Acidificación de la lactosa	Rojo	Amarillo
TRE	Acidificación de la D-trehalosa	Rojo	Amarillo
MAN	Acidificación de la D-manitol	Rojo	Amarillo
XLT	Acidificación del xilitol	Rojo	Amarillo
MEL	Acidificación de la D-melibiosa	Rojo	Amarillo
NIT	Reducción de nitratos a nitritos	Incoloro - rosa claro	Rojo
PAL	Fosfatasa alcalina	Amarillo	Violeta
VP	Producción de acetil-metil-carbinol	Incoloro - rosa claro	Violeta-rosáceo
RAF	Acidificación de la rafinosa	Rojo	Amarillo
XYL	Acidificación de la xilosa	Rojo	Amarillo
SAC	Acidificación de la sacarosa	Rojo	Amarillo
MDG	Acidificación de la metil- α D-Glucopiranosida	Rojo	Amarillo
NAG	Acidificación de la N-acetil-Glucosamina	Rojo	Amarillo
ADH	Arginina dihidrolasa	Amarillo	Naranja - Rojo
URE	Ureasa	Amarillo	Rojo – Violeta

Kit API® 20 Strep

La galería API® 20 Strep es un sistema estandarizado que asocia 20 ensayos bioquímicos que permiten realizar un diagnóstico de grupo o por especie de la mayoría de los estreptococos, enterococos, y para los gérmenes emparentados más corrientes.

Material y Métodos

La galería API® 20 Strep se compone de 20 microtubos que contienen sustratos deshidratados para la detección de actividades enzimáticas o de fermentación de azúcares que se traducen en variaciones de coloración, espontáneas o reveladas mediante la adición de reactivos (<http://apiweb.biomerieux.com>).

La lectura de estas reacciones se realizó con la ayuda de la Tabla de Lectura (Tabla 7) y la identificación se obtuvo mediante el Software de Identificación.

Tabla 7. Tabla de identificación de las reacciones de las pruebas del API® 20 Strep.

Tests	Reacciones-Enzimas	Resultado Negativo		Resultado Positivo	
VP	Producción de acetona	Incoloro		Rosa-rojizo	
HIP	Hidrólisis (ácido hipúrico)	Incoloro/Azul pálido - Gris azulado		Azul oscuro / Violeta	
		4h	24h	4h	24h
ESC	Hidrólisis β -glucosidasa	Incoloro - Amarillo pálido	Incoloro - Amarillo pálido / Gris Claro	Negro – Gris	Negro
PYRA	Pirolidonicarilamidasa	Incoloro o Naranja muy pálido		Naranja	
αGAL	α -galactosidasa	Incoloro		Violeta	
βGUR	β -glucuronidasa	Incoloro		Azul	
βGAL	β -galactosidasa	Incoloro o Violeta muy pálido		Violeta	
PAL	Fosfatasa alcalina	Incoloro o Violeta muy pálido		Violeta	
LAP	Leucina aminopeptidasa	Incoloro		Naranja	
ADH	Arginina dihidrolasa	Amarillo		Rojo	
		4h	24h	4h	24h
RIB	Acidificación de la ribosa	Rojo	Naranja/Rojo	Naranja/amarillo	Amarillo
ARA	Acidificación de la arabinosa	Rojo	Naranja/Rojo	Naranja/amarillo	Amarillo
MAN	Acidificación del manitol	Rojo	Naranja/Rojo	Naranja/amarillo	Amarillo
SOR	Acidificación del sorbitol	Rojo	Naranja/Rojo	Naranja/amarillo	Amarillo
LAC	Acidificación de la lactosa	Rojo	Naranja/Rojo	Naranja/amarillo	Amarillo
TRE	Acidificación de la trehalosa	Rojo	Naranja/Rojo	Naranja/amarillo	Amarillo
INU	Acidificación de la inulina	Rojo	Naranja/Rojo	Naranja/amarillo	Amarillo
RAF	Acidificación de la rafinosa	Rojo	Naranja/Rojo	Naranja/amarillo	Amarillo
AMD	Acidificación del almidón	Rojo	Naranja/Rojo	Naranja/amarillo	Amarillo
GLYG	Acidificación del glicógeno	Rojo o naranja		Amarillo	

Kit API[®] 50 CH

El API[®] 50 CH es un sistema estandarizado compuesto por 50 ensayos bioquímicos destinados al estudio del metabolismo de los hidratos de carbono en los microorganismos. El API[®] 50 CH se utiliza en combinación con la solución API 50 CHL Medium[®] para la identificación de *Lactobacillus* spp. y microorganismos próximos, o con la API 50 CHB/E Medium[®] para la identificación de *Bacillus* spp. y microorganismos próximos y de *Enterobacteriaceae* y *Vibrionaceae*.

La galería API[®] 50 CH permite el estudio de la fermentación de sustrato perteneciente a la familia de los hidratos de carbono y derivados (Tabla 8). En los ensayos de fermentación se inoculan los microtubos con una suspensión bacteriana realizadas en el API 50 CHL Medium[®] o en el API 50 CHB/E Medium[®] que rehidratan los sustratos. Las fermentaciones se traducen en cambios de color en los tubos debido a la producción de ácido en anaerobiosis revelada por el indicador de pH del medio elegido. El primer tubo, sin principio activo, sirve como control negativo (<http://apiweb.biomerieux.com>).

Material y Métodos

Tabla 8. Ensayos bioquímicos presentes en el sistema comercial API® 50CH.

0	Control	10	D-galactosa	20	Metil- α D-manopiranosida	30	D-melibiosa	40	D-turanosa
1	Glicerol	11	D-glucosa	21	Metil- α D-glucopiranosida	31	D-sacarosa	41	D-lixosa
2	Eritritol	12	D-fructosa	22	N-acetil-glucosamina	32	D-trehalosa	42	D-tagatosa
3	D-arabinosa	13	D-manosa	23	Amigdalina	33	Inulina	43	D-fucosa
4	L-arabinosa	14	L-sorbosa	24	Arbutina	34	D-melezitosa	44	L-fucosa
5	D-ribosa	15	L-rhamnosa	25	Esculina	35	D-rafinosa	45	D-arabitol
6	D-xilosa	16	Dulcitol	26	Salicina	36	Almidón	46	L-arabitol
7	L-xilosa	17	Inositol	27	D-celobiosa	37	Glicógeno	47	Gluconato potásico
8	D-adonitol	18	D-manitol	28	D-maltosa	38	Xilitol	48	2-cetogluconato potásico
9	Metil- β D-xilopiranosida	19	D-sorbitol	29	D-lactosa	39	Gentiobiosa	49	5-cetogluconato potásico

Kit API® 20 C AUX

La galería API® 20 C AUX es un sistema para la identificación precisa de las levaduras que se encuentran más frecuentemente. Está constituida por 20 cúpulas con sustratos deshidratados que permiten efectuar 19 ensayos de asimilación (Tabla 9). Las cúpulas se inoculan con un medio mínimo semi-agar y el crecimiento de las levaduras solo será posible si tienen la capacidad de utilizar el sustrato correspondiente (<http://apiweb.biomerieux.com>).

La lectura de estas reacciones se realizaron por comparación con los testigos de crecimiento y la identificación se obtuvo con la ayuda del software de identificación.

Tabla 9. Ensayos de asimilación presentes en el sistema comercial API® 20 C AUX.

0	Ninguno	10	D-sorbitol
1	D-glucosa	11	Metil- α D-glucopiranosida
2	Glicerol	12	N-acetil-glucosamina
3	2-ceto-gluconato cálcico	13	D-celiobiosa
4	L-arabinosa	14	D-lactosa
5	D-xilosa	15	D-maltosa
6	Adonitol	16	D-sacarosa
7	Xilitol	17	D-trehalosa
8	D-galactosa	18	D-melezitosa
9	Inositol	19	D-rafinosa

3. Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante un paquete estadístico IBM SPSS para Windows 25.0 (IBM Corp.; Armonk, Nueva York, EE.UU.). En todos los casos, se utilizaron tablas de contingencia y las diferencias entre proporciones se analizaron mediante el cálculo del estadístico Z, cuya hipótesis nula asume la distribución normal estándar. Asimismo, se llevó a cabo también, para cada caso, la prueba de la Chi-cuadrado para la comparación de frecuencias en la tabla de contingencia. El nivel de significación se estableció en $P \leq 0,05$.

4. Conservación de las cepas aisladas

4.1. Métodos de conservación microbiana

Las muestras del bloque 1 llegaron al laboratorio en tandas de numerosos hisopos que debían ser procesados al mismo tiempo. Esto dio como resultado numerosos aislamientos que debían conservarse en refrigeración para su posterior identificación mediante pruebas bioquímicas básicas y sistemas miniaturizados API[®]. Para resolver esta problemática, y con el fin de mantener las colonias aisladas y conservadas a corto plazo, se sembraron en tubos con agar inclinado. No obstante, para la conservación a largo plazo se utilizó la conservación por liofilización.

Las muestras del Bloque 2 llegaron al laboratorio para su procesamiento en tandas de entre 1 a 2 hisopos semanales, lo que permitió prescindir de la metodología de conservación a corto plazo. Sin embargo, una vez identificadas las especies microbianas se conservaron a largo plazo por crioconservación para su posterior uso.

a) Liofilización

Una vez identificados los cultivos aislados se almacenaron tras un proceso de liofilización. La liofilización es un método de conservación basado en la eliminación del agua de una sustancia congelada por sublimación del hielo bajo vacío (Arencibia *et al.*, 2008). Este proceso consta de tres etapas: (1) la congelación de los productos a liofilizar; (2) el secado primario, basado en la sublimación del hielo en condiciones de vacío; y (3) el secado secundario en el cual mediante evaporación se elimina el resto de humedad que pueda quedar (Orrego, 2008).

Previamente a la liofilización, se realizó un cultivo en *overnight* aislado en tubos de fondo cónico especiales para centrífuga. Los tubos se centrifugaron a 3613xg durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se conservó el *pellet*. El *pellet* se resuspendió en una solución crioprotectora previamente esterilizada (15% de leche desnatada y 4% de sacarosa). Se repartió en viales de vidrio estériles y se entrecerraron con tapones de goma para viales de manera que permitiese la salida de los productos gaseosos de la sublimación. A continuación, los viales se colocaron en el soporte del liofilizador (Alpha 1-2 LD, Fisher Scientific S.L., España) y se congelaron a -20°C durante 24 horas \pm 2 horas.

Transcurrido el tiempo de congelación, se colocó el soporte dentro del liofilizador y se puso en funcionamiento, no sin antes asegurar una buena formación del vacío y una temperatura de -52°C. El tiempo de liofilización se mantuvo entre 24 y 48 horas en función de la cantidad de liófilos que se quisieron obtener. Finalizado el proceso de liofilización, se cerraron los viales dentro del liofilizador. De esta manera, el contenido quedó sellado al vacío evitando la contaminación ambiental. Inmediatamente se retiraron los viales del liofilizador, se comprobó si la liofilización había sido correcta y se procedió a la encapsulación de los viales. Los viales se conservaron y almacenaron a temperatura ambiente evitando la exposición directa de la luz. Para la recuperación de los cultivos liofilizados se reconstituyeron los viales con el cultivo líquido adecuado para la bacteria, se incubó durante 24 horas \pm 2 horas y, finalmente, se sembró en placa de cultivo.

b) Crioconservación

La conservación por congelación o crioconservación se basa en la detención del crecimiento celular o actividad metabólica a temperaturas de congelación de -20°C a -40°C, o bien a temperaturas de ultracongelación de -70°C a -90°C (Belmonte *et al.*, 2008). Para poder realizar la conservación por congelación se utilizaron los crioviales estériles Cryoinstant[®] (Deltalab S.L., España) provistos de 25 crioperlas de vidrio tratadas con crioprotectores con función conservante.

Mediante un asa de Kolle estéril, se recogió una colonia procedente de un cultivo joven (de menos de 24 horas de incubación) y se inoculó en el criovial introduciendo el asa en el medio conservante.

El criovial se cerró y se agitó suavemente para que la cepa se impregnase en las crioperlas. Una vez agitado, se extrajo el medio conservante sobrante con ayuda de una pipeta, se cerró el criovial y se congeló a -80°C. Para la recuperación de los cultivos, se extrajo el vial Cryoinstant[®] del congelador e inmediatamente se extrajeron una o dos perlas mediante una pinza estéril. Las crioperlas se depositaron en el medio líquido adecuado para la bacteria y se dejó incubar durante 24 horas \pm 2 horas a las condiciones de temperatura y respiración óptimas para el microorganismo. Pasado el tiempo de incubación se realizó un aislamiento en placa a partir del crecimiento en medio líquido.

4.2. Determinación de la viabilidad de las cepas tras la criopreservación y la liofilización

Al utilizar dos métodos de conservación a largo plazo, surgió la necesidad de comprobar si la preservación microbiana se mantenía a lo largo del tiempo y, a su vez, nos ayudó a observar cuál de los dos métodos fue el más eficaz.

En primer lugar, se escogieron tres microorganismos diferentes procedentes de las identificaciones bacterianas de ambos bloques: *Escherichia coli*, *Lactobacillus curvatus* y *Staphylococcus aureus*. Una vez elegidos los microorganismos, éstos se conservaron tanto en Crioviales Cryoinstant[®] (Deltalab S.L., España) como en liófilos. Los microorganismos se fueron recuperando en diferentes períodos de tiempo como se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10. Períodos de tiempo de recuperación de los crioviales y liófilos.

	Tiempo							
Liófilos	Pre-liofilización	0h	24h	48h	7d	15d	30d	90d
Crioviales	Pre-congelación	0h	24h	48h	7d	15d	30d	90d

En la recuperación de los liófilos se inoculó 1 mL de Ringer (Scharlab S.L., Sentmenat, España) para resuspender el producto liofilizado y así realizar inmediatamente bancos de diluciones hasta la dilución 10^{-8} .

En el caso de los crioviales, se extrajeron una o dos perlas, se depositaron en infusión de cerebro y corazón (BHI) (Laboratorios Conda S.A., España), un medio líquido de enriquecimiento, y se incubaron a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas \pm 2 horas en las condiciones de respiración adecuadas para el microorganismo. Pasado el tiempo de incubación, se llevaron a cabo los bancos de diluciones hasta la dilución 10^{-8} .

Una vez realizadas las diluciones se inocularon en sus respectivas placas de agar y se incubaron a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas \pm 2 horas en las condiciones de respiración adecuadas para el microorganismo:

- *Escherichia coli*: agar MacConkey (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) en aerobiosis.
- *Staphylococcus aureus*: agar Baird Parker (BIOKAR Diagnostics, Beauvés, Francia) en aerobiosis.
- *Lactobacillus curvatus*: Agar MRS (BIOKAR Diagnostics, Beauvés, Francia) en jarra de anaerobiosis con Anaerocult A[®] (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

Pasado el tiempo de incubación, se llevó a cabo el recuento de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) y se anotó la concentración microbiana recuperada de ambos métodos de conservación en cada uno de los tiempos establecidos. Para el recuento se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/mL} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de colonias por placa} \cdot \text{Factor de dilución}}{\text{mL de la muestra sembrada}}$$

5. Evaluación de los probióticos

5.1. Identificación de las bacterias ácido lácticas

Se evaluaron 13 cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) procedentes de la microbiota genital de perras de ambos bloques siguiendo las *Directrices para la evaluación de los Probióticos en los Alimentos* (Consulta de expertos, F.A.O., 2006), elaboradas conjuntamente por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2002.

5.1.1. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas

Las BAL se seleccionaron a partir de los crecimientos obtenidos en agar MRS (BIOKAR, Beauvès, Francia). Para ello, se llevaron a cabo aislamientos de estos cultivos para obtener cepas completamente aisladas. A partir de los cultivos puros se realizaron tinciones de Gram y tinciones de esporas con verde de malaquita (consultar *Tinción de Gram* y *Tinción de esporas* del apartado 2.2.1. Características macroscópicas y microscópicas, incluido en la sección “Identificación microbiana”). Mediante estas tinciones se seleccionaron aquellas bacterias Gram positivas de morfología bacilar o cocoide, no formadoras de esporas.

5.1.2. Pruebas bioquímicas

Las BAL aisladas se sometieron a las pruebas de la catalasa, oxidasa y hemólisis (consultar *Prueba de la catalasa*, *Prueba de la oxidasa* y *Actividad hemolítica* del apartado 2.2.2. Pruebas bioquímicas básicas y galerías miniaturizadas, incluido en la sección “Identificación microbiana”).

A partir de los resultados obtenidos en las anteriores pruebas bioquímicas básicas, se seleccionaron aquellas bacterias que fuesen catalasa y oxidasa negativas, descartando todas aquellas que presentasen capacidad β -hemolítica y dando prioridad a aquellas BAL con capacidad γ -hemolítica. Seleccionadas las cepas siguiendo el anterior criterio, se procedió a la identificación de los cultivos mediante el *kit* API[®] 50 CHL + 50 CHL Medium[®] (consultar apartado *Kit API[®] 50 CH* del apartado 2.2.2. Pruebas bioquímicas básicas y galerías miniaturizadas, incluido en la sección “Identificación microbiana”).

5.2. Evaluación del potencial probiótico de las bacterias ácido lácticas

5.2.1. Determinación de la seguridad de las cepas con potencial probiótico

Para la evaluación de la sensibilidad a los antibióticos *in vitro* de las bacterias ácido lácticas seleccionadas se utilizó la técnica fenotípica de difusión. Las BAL seleccionadas e identificadas se enfrentaron a los 9 antibióticos que dictaminan las directrices de la *Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance* (Tabla 11) elaborada por el panel de la EFSA sobre aditivos y productos o sustancias empleadas en la alimentación animal (FEEDAP) basada en los datos publicados por el Comité

Europeo de Pruebas de Sensibilidad Antimicrobiana (EUCAST), y de los programas nacionales y europeos de supervisión (EFSA, 2012).

Tabla 11. Grupo de antibióticos requeridos por la EFSA para la evaluación de bacterias ácido lácticas potencialmente probióticas (EFSA, 2012).

	Ampicilina	Vancomicina	Gentamicina	Kanamicina	Estreptomina	Eritromicina	Clindamicina	Tetraciclina	Cloramfenicol
<i>Lactobacillus</i> homofermentativos obligados	1	2	16	16	16	1	1	4	4
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1	2	16	64	16	1	1	4	4
<i>Lactobacillus</i> heterofermentativos obligados	2	n.r.	16	32	64	1	1	8	4
<i>Lactobacillus reuteri</i>	2	n.r.	8	64	64	1	1	16	4
<i>Lactobacillus</i> heterofermentativo facultativo	4	n.r.	16	64	64	1	1	8	4
<i>Lactobacillus plantarum/pentosus</i>	2	n.r.	16	64	n.r.	1	2	32	8
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	4	n.r.	16	64	32	1	1	8	4
<i>Lactobacillus casei/paracasei</i>	4	n.r.	32	64	64	1	1	4	4
<i>Bifidobacterium</i> spp.	2	2	64	n.r.	n.r.	1	1	8	4
<i>Pediococcus</i> spp.	4	n.r.	16	64	64	1	1	8	4
<i>Lactococcus lactis</i>	2	4	32	64	64	1	1	4	8

Valores expresados en mg/mL ,n.r. = no requerido.

a) Método de difusión en disco

Para llevar a cabo un primer cribado, las cepas BAL se sometieron a un ensayo de difusión en placa mediante discos de susceptibilidad antimicrobiana (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) sobre placas de agar Mueller Hinton (Biolifes.r.l., Milán, Italia), medio indicado para la determinación de ensayos de susceptibilidad antimicrobiana.

En primer lugar, se realizó una suspensión de cada una de las BAL seleccionadas en Ringer (Scharlab S.L., Sentmenat, España) de turbidez 0,5 en la escala de McFarland® (BioMérieux S.A., Francia). Inmediatamente, de cada una de las suspensiones se sembraron 100 µL en sus respectivas placas de Mueller Hinton y se repartieron mediante el asa de Digraidsky de modo que

quedara una distribución completamente homogénea. Una vez sembradas las cepas, se depositaron los discos de antibióticos (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Alemania; Liofilchems.r.l., Roseto, Italia) sobre las placas de Mueller Hinton presionando con suavidad el disco contra el agar para asegurar un buen contacto. A continuación, las placas se incubaron durante 24 horas \pm 2 horas a las condiciones de temperatura y respiración adecuadas para cada bacteria. Pasado el tiempo de incubación se procedió a la lectura de los resultados de las posibles interacciones cultivo-antibiótico.

Las bacterias que fueron sensibles a los antibióticos mostraron zonas translúcidas sin crecimiento microbiano alrededor de los discos. Estos halos de inhibición se midieron con la ayuda del pie de rey y se realizó una media del valor. Los diámetros obtenidos se compararon con las tablas proporcionadas por la empresa fabricante de los discos de antibióticos. La lectura de los halos de inhibición permitió la clasificación de los microorganismos en sensibles o resistentes frente a los antibióticos ensayados.

b) Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) en cultivo líquido

Aquellas cepas que no superaron los ensayos de sensibilidad por difusión en disco se volvieron a evaluar utilizando el método cuantitativo para la determinación de la CMI en cultivo líquido. El valor CMI se define como la concentración mínima de antimicrobiano que inhibe el crecimiento bacteriano. Se prepararon tubos de ensayo con agar MRS líquido (BIOKAR, Beauvès, Francia) con las concentraciones de antibiótico (Sigma-Aldrich Inc., USA; Panreac Química S.A., Barcelona, España) necesarias (Tabla 11) esterilizados mediante filtración.

Las cepas se incubaron en las condiciones de respiración y temperatura adecuadas durante 24 horas \pm 2 horas junto con sus respectivos controles sin antibiótico. Pasado el tiempo de incubación, se observó el crecimiento de cada uno de los tubos midiendo la presencia o ausencia de turbidez en el medio de cultivo. La ausencia de turbidez no fue significativa para confirmar la ausencia de crecimiento, por lo que en estos casos se sembró una alícuota en placa de MRS agar (BIOKAR, Beauvés, Francia) a las mismas condiciones de respiración y temperatura durante otras 24 horas \pm 2 horas. El crecimiento tanto en el tubo con antibiótico como en placa indicó resistencia por parte de la cepa BAL.

c) Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) en placa de agar

Las cepas BAL que no superaron la evaluación de la CMI en medio líquido se volvieron a evaluar mediante placa de agar. Consistió en inocular diferentes concentraciones de la cepa BAL por inclusión en una placa de agar MRS líquido con la respectiva concentración de antibiótico (Sigma-Aldrich Inc., USA; Panreac Química S.A., Barcelona, España) y se dejó solidificar.

Los antibióticos se prepararon en suspensiones 10 veces concentradas en MRS líquido (BIOKAR, Beauvés, Francia) y se esterilizó mediante filtración. En el caso de las cepas BAL, se prepararon alícuotas a 10^5 , 10^6 y 10^7 UFC/mL. A continuación, en una placa estéril para cada suspensión de microorganismo se añadieron 18 mL de agar MRS (BIOKAR, Beauvés, Francia) junto con 2 mL de la suspensión de antibiótico y 200 μ L de la suspensión de la cepa. Además, como control positivo se sembró una placa de agar MRS para cada concentración de las cepas, así como un control negativo sustituyendo la suspensión de antibiótico por 2 mL adicionales de MRS líquido. Se homogeneizaron y se dejaron secar. Una vez solidificados se incubaron durante 24 horas \pm 2 horas a las condiciones de temperatura y respiración

óptimas para cada microorganismo. Pasado el tiempo de incubación, se compararon las placas con antibióticos con los controles positivos. Los resultados esperados para que las cepas potencialmente probióticas pasaran este último cribado debía manifestarse la ausencia de crecimiento en las placas con antibiótico. En el caso de observarse crecimiento en dichas placas se consideró la cepa resistente al antibiótico.

d) Determinación de la capacidad hemolítica

La capacidad hemolítica es un factor de virulencia conocido entre los microorganismos patógenos (Charalampopoulos y Rastall, 2009). Para determinar la capacidad hemolítica de las cepas BAL seleccionadas, éstas se sembraron en agar Columbia + 5% de sangre de cordero (consultar el apartado *Actividad hemolítica* del apartado 2.2.2. Pruebas bioquímicas básicas y galerías miniaturizadas del apartado "Identificación microbiana").

5.2.2. Evaluación de la resistencia a las condiciones gastrointestinales

Las cepas BAL con potencial probiótico deben ser capaces de resistir a las condiciones gastrointestinales sin perder su viabilidad para llevar a cabo eficazmente sus efectos beneficiosos en el organismo. Para ello, se realizaron diferentes ensayos *in vitro* de las cepas BAL seleccionadas con el objetivo de cuantificar su supervivencia en las condiciones gastrointestinales: resistencia a lisozima (Sigma-Aldrich Co., USA), sales biliares (Sigma-Aldrich Co., USA), peróxido de hidrógeno (Sigma-Aldrich Co., USA) y pH (Panreac Química S.A., Barcelona, España) (Dunneet *al.*, 2001). Todas las cepas BAL que superaron los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana se incubaron en MRS líquido (BIOKAR, Beauvès, Francia) durante 24 horas \pm 2 horas en las condiciones de

respiración y temperatura adecuadas para cada una. Los ensayos se realizaron por triplicado. Las concentraciones que se debieron realizar en cada pocillo de las microplacas ELISA (Deltalab, SL, Rubí, España) están detalladas en la Tabla 12. Todas las diluciones se realizaron en MRS líquido.

Tabla 12. Concentraciones de los reactivos y condiciones de incubación utilizadas en la evaluación de la resistencia a las condiciones gastrointestinales de las cepas BAL.

Reactivos para los ensayos de resistencia a las condiciones gastrointestinales				
Rangos de concentración	Peróxido de hidrógeno	Lisozima	pH ácido (ajustado con HCl 1M)	Sales biliares
	30 µg/mL	100 µg/mL	De 1,5 a 6,5 (en intervalos de 0,5)	0,3% p/v
	20 µg/mL	200 µg/mL		0,5% p/v
	10 µg/mL	300 µg/mL		1% p/v
Condiciones de incubación	37°C, 30 minutos	37°C, 60 minutos	42°C, 120 minutos	37°C, 180 minutos

Los pocillos de las placas ELISA (Deltalab, SL, Rubí, España) se inocularon de la siguiente manera:

- Se depositaron 200 µL de cada concentración de reactivo en sus respectivos pocillos.
- Se añadieron 20 µL de cultivo de cada cepa en sus respectivos pocillos.
- Se realizó un control negativo para cada concentración de los diversos reactivos sustituyendo los 20 µL de cultivo de cepa por 20 µL de MRS líquido (BIOKAR, Beauvès, Francia).
- Se llevó a cabo un control positivo para cada cepa de BAL sustituyendo los 200 µL de concentración de reactivos por 200 µL de MRS líquido.
- Se añadió un control del medio de cultivo inoculando un pocillo con 220µL de MRS líquido.

Una vez inoculados, los pocillos se incubaron a las condiciones detalladas en la Tabla 12. Pasado el tiempo de incubación se procesaron en el lector ELISA (Labsystems Multiscan RC, Thermo, Finlandia) realizando las lecturas a una longitud de onda de 620 nm.

La interpretación de los resultados se realizó según los siguientes criterios:

- Tolerancia a la lisozima: se expresa como la menor concentración capaz de inhibir completamente el desarrollo de la cepa. En este estudio, la concentración ha sido $\geq 300\mu\text{g/mL}$ de lisozima.
- Tolerancia al medio ácido: se expresa como el menor pH en el cual la densidad óptica detectada es, como mínimo, el 40% de la detectada a pH 6,5. En este estudio se consideró la resistencia a pH entre 2 y 4.
- Tolerancia a las sales biliares: permite comparar la resistencia a este parámetro entre las diversas cepas BAL. Se consideró una capacidad de crecimiento en un 0,3% de sales biliares
- Tolerancia al peróxido de hidrógeno: se expresa como la menor concentración capaz de inhibir completamente el desarrollo de la cepa. En este estudio se ha utilizado una concentración $\geq 30\mu\text{g/mL}$ de H_2O_2 (Girmé, 2015).

5.2.3. Determinación de la actividad antimicrobiana de las cepas BAL

Una vez obtenidas las cepas BAL que superaron las evaluaciones de seguridad y resistencia a las condiciones gastrointestinales, se valoró la eficacia *in vitro* de cada una de la cepas contra una serie de microorganismos potencialmente patógenos (Tabla 13).

Tabla 13. Microorganismos potencialmente patógenos utilizados en la evaluación de la actividad antimicrobiana de las cepas BAL.

Microorganismos potencialmente patógenos		
<i>Kocuria rhizophila</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Proteus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.
<i>Salmonella tiphymurium</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria innocua</i> .

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana se utilizaron dos modificaciones de la técnica de difusión en disco de Kirby Bauer. El antibiograma disco-placa basado en el trabajo de Bauer Kirby y colaboradores es uno de los métodos que el *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) (Wayne, 2000) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos (García *et al.*, 2000). El antibiograma disco-placa consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa de Petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar.

a) Primera modificación del método de Kirby Bauer

En la primera modificación del método de Kirby Bauer se sustituyeron los antibióticos con los que se impregnarían los discos de susceptibilidad antimicrobiana por diluciones de 0,5 en la escala de McFarland[®] (BioMérieux SA, Francia) de las cepas BAL con potencial probiótico.

En primer lugar, en tubos de Ringer (Scharlab S.L., Sentmenat, España), se realizó una dilución de 0,5 en la escala de McFarland[®] para cada uno de los microorganismos potencialmente patógenos. Inmediatamente, se inocularon 100 μ L de cada concentración de microorganismo en placas de Mueller Hinton (Biolifes.r.l., Milán, Italia). En segundo lugar, se realizó en tubos de Ringer (Scharlab S.L., Sentmenat, España) una dilución de 0,5 en la escala de McFarland[®] (BioMérieux S.A., Francia) de cada una de las cepas BAL con potencial probiótico. Con la ayuda de unas pinzas estériles, se humedecieron discos de susceptibilidad antimicrobiana estériles (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) en sus respectivas concentraciones de BAL y se depositaron en cada una de las placas sembradas con los microorganismos patógenos asegurando un buen contacto entre agar-disco. Para cada microorganismo, patógeno y BAL, se realizaron controles positivos inoculando 100 μ L de las

concentraciones realizadas en placas de agar Mueller Hinton. Las placas se cerraron y se incubaron a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas \pm 2 horas.

Pasado el tiempo de incubación, se procedió a leer las interacciones entre microorganismos reflejadas en la presencia o ausencia de halos de inhibición de crecimiento microbiano alrededor de los discos.

b) Segunda modificación del método de Kirby Bauer

En la segunda modificación del método de Kirby Bauer se sustituyeron los discos de susceptibilidad antimicrobiana estériles por discos de agar con crecimiento de BAL con potencial probiótico. Estos discos se formaron a partir del previo crecimiento de las BAL en placas de agar MRS (BIOKAR, Beauvès, Francia) mediante un sacabocados esterilizado.

En primer lugar, se prepararon concentraciones de 0,5 en la escala de McFarland[®] (BioMérieux SA, Francia) de cada una de las cepas BAL. A continuación, se inocularon 100 μL de cada concentración en placas de agar MRS (BIOKAR, Beauvès, Francia) y se repartieron homogéneamente por toda la placa. Las placas se incubaron durante 24 horas \pm 2 horas a las condiciones de respiración y temperatura adecuadas para cada bacteria. Pasado el tiempo de incubación, se llevó a cabo la obtención de discos de agar de cada uno de los crecimientos de las bacterias ácido lácticas mediante un sacabocados estéril. En segundo lugar, se realizó la siembra en agar Mueller Hinton (Biolifes.r.l., Milán, Italia) de cada una de las bacterias potencialmente patógenas.

El siguiente paso fue colocar los discos de agar en las placas de Mueller Hinton para que se produjera la interacción entre microorganismos. Para ello, mediante un asa de Kolle estéril, se recogieron los discos de agar y se depositaron en las placas de manera que la cara del disco con crecimiento

bacteriano mantuviese contacto directo con el agar Mueller Hinton. A continuación, las placas se incubaron durante 24 horas \pm 2 horas a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en aerobiosis. Pasado el tiempo de incubación se procedió a leer las interacciones entre microorganismos reflejadas en la presencia o ausencia de halos de inhibición de crecimiento microbiano alrededor de los discos de agar.

Resultados

1. Identificaciones bacterianas

En el 100% de las muestras recogidas en el estudio hubo crecimiento bacteriano. Los aislamientos bacterianos de cada muestra se obtuvieron en condiciones de respiración aeróbica y/o anaeróbica (Anexo I) y, posteriormente, se clasificaron según el tipo de respiración propia de cada uno de los microorganismos. Los resultados globales de los aislamientos obtenidos en el Bloque 1 (grupos de los Núcleos Zoológicos) y en el Bloque 2 (grupos de la FHCV) según las condiciones de incubación se expresan en la Tabla 14.

Tabla 14. Microorganismos aislados en los animales estudiados de cada bloque y según las diferentes condiciones de incubación.

Bloque	Condiciones Aeróbicas	Condiciones Anaeróbicas
Bloque 1	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolíticos <i>Streptococcus</i> spp. β-hemolíticos <i>Escherichia coli</i> <i>Bacillus</i> spp. <i>Bacillus subtilis</i> <i>Lactococcus</i> spp. <i>Lactobacillus</i> spp. <i>Proteus</i> spp. <i>Staphylococcus</i> spp. <i>Staphylococcus capitis</i> <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactobacillus plantarum 1</i> <i>Lactococcus acidophilus</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Acinetobacter</i> spp. <i>Kocuria rhizophila</i> <i>Kocuria varians</i> <i>Salmonella</i> spp. <i>Mannheimia haemolytica</i>	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolíticos <i>Streptococcus</i> spp. β-hemolíticos <i>Escherichia coli</i> <i>Bacillus</i> spp. <i>Bacillus subtilis</i> <i>Lactococcus</i> spp. <i>Lactobacillus</i> spp. <i>Proteus</i> spp. <i>Bacteroides</i> spp. <i>Bacteroides ovatus</i> <i>Bifidobacterium</i> spp. <i>Leuconostoc</i> spp.

Resultados

Tabla 14. Continuación.

Bloque	Condiciones Aeróbicas	Condiciones Anaeróbicas
Bloque 2	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolíticos <i>Streptococcus</i> spp. β-hemolíticos <i>Escherichia coli</i> <i>Proteus</i> spp. <i>Proteus mirabilis</i> <i>Bacillus</i> spp. <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Lactococcus</i> spp. <i>Lactobacillus</i> spp. <i>Kocuria rhizophila</i> <i>Flavobacterium</i> spp. <i>Acinetobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Pseudomonas putida</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Salmonella</i> spp. <i>Salmonella enterica</i> spp. <i>arizonae</i> <i>Kocuria</i> spp. <i>Bacillus subtilis</i> <i>Klebsiella</i> spp. <i>Enterococcus</i> spp. <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolíticos <i>Streptococcus</i> spp. β-hemolíticos <i>Escherichia coli</i> <i>Proteus</i> spp. <i>Proteus mirabilis</i> <i>Bacillus</i> spp. <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Lactococcus</i> spp. <i>Lactobacillus</i> spp. <i>Kocuria rhizophila</i> <i>Flavobacterium</i> spp. <i>Bacteroides</i> spp.

Los resultados individuales de los distintos aislamientos se especifican en el Anexo II y se clasificaron según el tipo de respiración de cada bacteria. Los animales del Bloque 1 se agruparon según su procedencia y género y los animales procedentes del Hospital Clínico Veterinario se agruparon según el motivo de la visita y se especificaron la raza, edad y condición clínica.

2. Aislamientos bacterianos globales de los animales estudiados

2.1 Resultados de los recuentos microbianos

Los resultados globales de los aislamientos obtenidos en cada grupo, clasificados según los diferentes tipos de respiración, se reflejan en la Tabla 15.

Tabla 15. Microorganismos aislados en cada uno de los grupos y según el tipo de respiración

Grupos	M. Aeróbico	M. Anaeróbico facultativo	M. Anaeróbico estricto
N1 (n=10)	<i>Bacillus</i> spp. <i>Bacillus subtilis</i> <i>S. aureus</i> <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> <i>Staphylococcus capitis</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Streptococcus</i> spp. no hemolíticos <i>Streptococcus</i> spp. β-hemolíticos <i>Lactococcus</i> spp. <i>Lactococcus acidophilus</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactobacillus</i> spp. <i>Lactobacillus plantarum</i> 1 <i>Mannheimia hemolytica</i> <i>Proteus</i> spp. <i>Leuconostoc</i> spp. <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Salmonella enterica</i> spp. <i>arizonae</i>	<i>Bacteroides</i> spp. <i>Bacteroides ovatus</i> <i>Bifidobacterium</i> spp
N2 (n=23)	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> <i>Kocuria rhizophila</i> <i>Bacillus</i> spp. <i>Bacillus subtilis</i> <i>Acinetobacter</i> spp. <i>Kocuria varians</i> <i>Kocuria rhizophila</i>	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolíticos <i>Streptococcus</i> spp. β-hemolíticos <i>Escherichia coli</i> <i>Lactococcus</i> spp. <i>Lactobacillus</i> spp. <i>Salmonella</i> spp.	<i>Bacteroides</i> spp.
N3 (n=17)	<i>Bacillus</i> spp. <i>Bacillus subtilis</i> <i>Kocuria varians</i> <i>Kocuria rhizophila</i> <i>Staphylococcus</i> spp. <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolíticos <i>Streptococcus</i> spp. β-hemolíticos <i>Lactococcus</i> spp. <i>Lactobacillus</i> spp. <i>Escherichia coli</i> <i>Proteus</i> spp. <i>Salmonella</i> spp.	

Núcleo Zoológico 1-3: N1-N3.

Resultados

Tabla 15. Continuación.

Grupos	M. Aeróbico	M. Anaeróbico facultativo	M. Anaeróbico estricto
CSCR (n=23)	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Kocuria</i> spp. <i>Kocuria rhizophila</i> <i>Bacillus</i> spp. <i>Bacillus subtilis</i> <i>Acinetobacter</i> spp. <i>Flavobacterium</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolíticos <i>Streptococcus</i> spp. β-hemolíticos <i>Lactococcus</i> spp. <i>Lactobacillus</i> spp. <i>Escherichia coli</i> <i>Proteus</i> spp. <i>Proteus mirabilis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Klebsiella</i> spp. <i>Salmonella</i> spp.	<i>Bacteroides</i> spp.
HC (n=48)	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus</i> spp. <i>Bacillus subtilis</i> <i>Acinetobacter</i> spp. <i>Kocuria rhizophila</i> <i>Flavobacterium</i> spp.	<i>Escherichia coli</i> <i>Streptococcus</i> spp. no hemolíticos <i>Streptococcus</i> spp. β-hemolíticos <i>Lactococcus</i> spp. <i>Lactobacillus</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Enterococcus</i> spp. <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Salmonella</i> spp. <i>Salmonella enterica</i> spp. <i>arizonae</i>	<i>Bacteroides</i> spp.
OCR (n=9)	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Kocuria rhizophila</i> <i>Flavobacterium</i> spp. <i>Bacillus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolíticos <i>Streptococcus</i> spp. β-hemolíticos <i>Lactobacillus</i> spp. <i>Lactococcus</i> spp. <i>Escherichia coli</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Pseudomonas putida</i>	
MHCV (n=5)	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus</i> spp. <i>Kocuria</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolíticos <i>Streptococcus</i> spp. β-hemolíticos <i>Escherichia coli</i> <i>Proteus</i> spp. <i>Proteus mirabilis</i> <i>Lactococcus</i> spp. <i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Bacteroides</i> spp.

CSCR: Con Signos Clínicos Reproductivos; HC: Hembras en celo; OCR: Otros Controles Reproductivos; MHCV: Machos del Hospital Clínico.

En la Figura 2 se muestran los 640 microorganismos aislados en el estudio, sin tener en cuenta a qué grupo pertenecía cada animal ni tampoco el sexo de los mismos. De los aislamientos obtenidos, se observó que *Staphylococcus pseudintermedius* fue la bacteria aislada con más frecuencia, obteniendo un total de 86 aislamientos (13,4% de los aislamientos totales), seguida de *Lactococcus* spp. con un total de 76 aislamientos (11,9%), *Escherichia coli* con un total de 73 aislamientos (11,4%) y *Streptococcus* spp. β -hemolíticos con un total de 72 aislamientos (11,3%).

Si separamos los aislamientos en cada uno de los grupos de estudio, observamos que en el Núcleo Zoológico 1 (Figura 3), el microorganismo predominante fue *Escherichia coli* con un total de 6 aislamientos (0,9% de los aislamientos totales) seguido de *Lactococcus* spp. con 5 aislamientos (0,78%), *Proteus* spp. con otros 5 aislamientos (0,78%), *Streptococcus* spp. β -hemolíticos con 4 aislamientos (0,6%) y *Streptococcus* spp. no hemolíticos con otros 4 aislamientos (0,6%).

En el Núcleo Zoológico 2 se observó que el microorganismo predominante fue *Escherichia coli* con 20 aislamientos (3,1% de los aislamientos totales), seguido de *Streptococcus* spp. no hemolíticos con 14 aislamientos (2,2%), *Lactococcus* spp. con 12 aislamientos (1,8%), *Streptococcus* spp. β -hemolíticos con 11 aislamientos (1,7%) y *Bacillus* spp. con 8 aislamientos (1,25%).

En el último Núcleo Zoológico, N3, se observó que el microorganismo predominante fue *E. coli* con un total de 14 aislamientos (2,9% de los aislamientos totales), seguido de *Streptococcus* spp. β -hemolíticos con 13 aislamientos (2%), *Streptococcus* spp. no hemolíticos con 11 aislamientos (1,7%), *Bacillus* spp. con 7 aislamientos (1,1%), *Staphylococcus pseudintermedius* con 6 aislamientos (0,9%) y *Proteus* spp. con otros 6 aislamientos (0,9%).

En la Figura 3 se muestran también los microorganismos obtenidos en los diferentes grupos de la FHCV, comprobando que en el grupo de hembras Con Signos Clínicos Reproductivos (CSCR) el microorganismo predominante fue *S. pseudintermedius* con un total de 16 aislamientos (2,5% de los aislamientos totales), seguido de *Lactococcus* spp. con 14 aislamientos (2,2%), *Streptococcus* spp. β -hemolíticos con 11 aislamientos (1,7%), *Bacillus* spp. con 9 aislamientos (1,4%) y *Proteus mirabilis* con 8 aislamientos (1,25%).

En el grupo de Hembras en Celo (HC) el microorganismo predominante fue *S. pseudintermedius* con un total de 42 aislamientos (6,5 % de los aislamientos totales) seguido de *Lactococcus* spp. con 30 aislamientos (4,7%), *Streptococcus* spp. β -hemolíticos con 27 aislamientos (4,2%), *Lactobacillus* spp. con 25 aislamientos (3,9%), *Bacillus* spp. con 20 aislamientos (3,1%), *Streptococcus* spp. no hemolíticos con otros 20 aislamientos (3,1%) y *E. coli* con 19 aislamientos (2,9%).

En el caso de las hembras para Otros Controles Reproductivos (OCR) el microorganismo predominante fue *S. pseudintermedius* con un total de 9 aislamientos (1,4% de los aislamientos totales) seguido de *Lactobacillus* spp. con 8 aislamientos (1,25%), *Lactococcus* spp. con otros 8 aislamientos (1,25%), *E. coli* con 6 aislamientos (0,9%) y *Streptococcus* spp. β -hemolíticos con 4 aislamientos (0,6%).

Por último, en el grupo de Machos del Hospital Clínico Veterinario (MHCV), el microorganismo predominante observado fue *S. pseudintermedius* con 4 aislamientos (0,6% de los aislamientos totales) seguido de *Bacillus* spp. con 3 aislamientos (0,4%).

Resultados

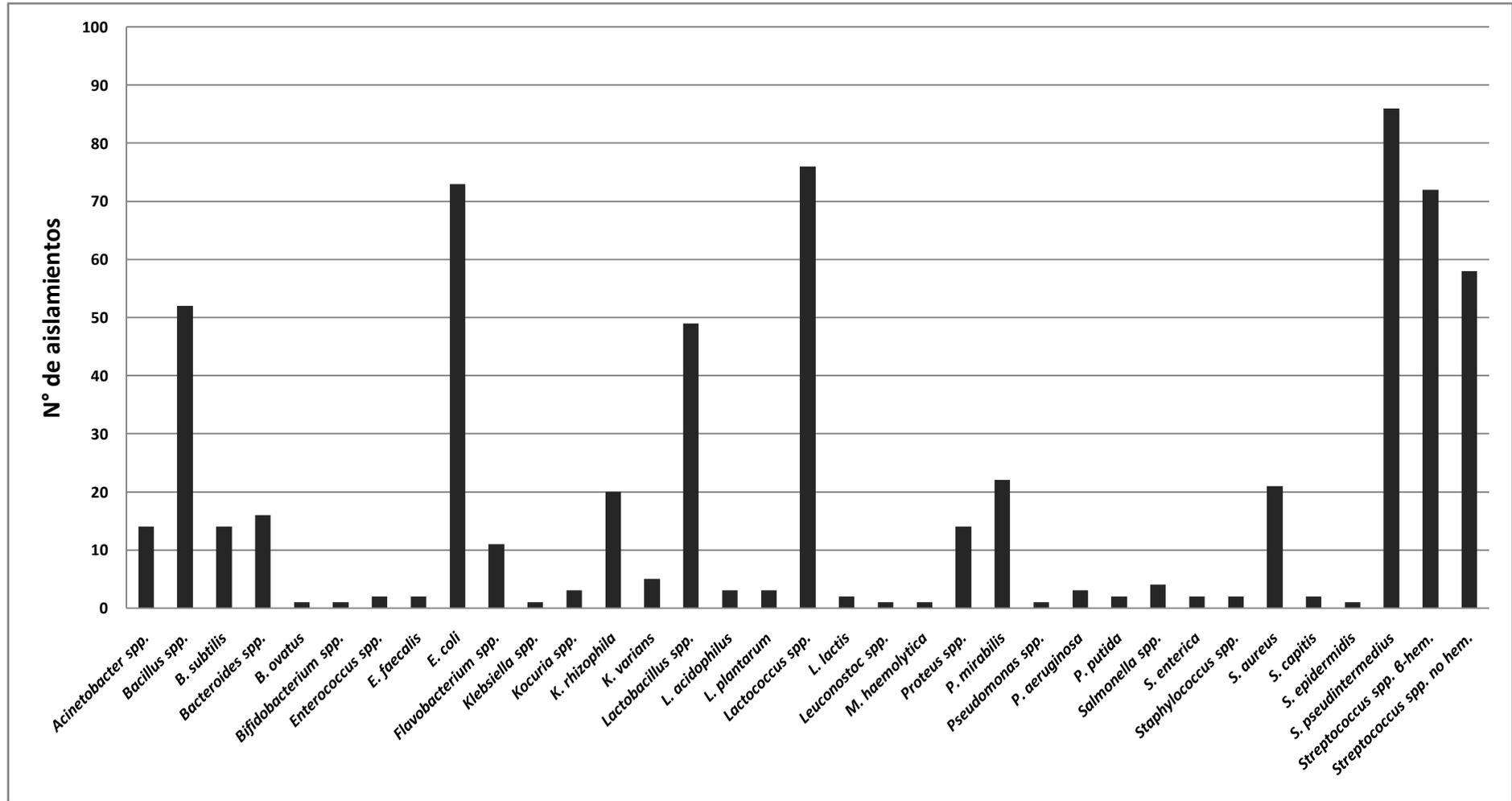


Figura 2. Número de aislamientos de los microorganismos obtenidos en la globalidad del estudio.

Resultados

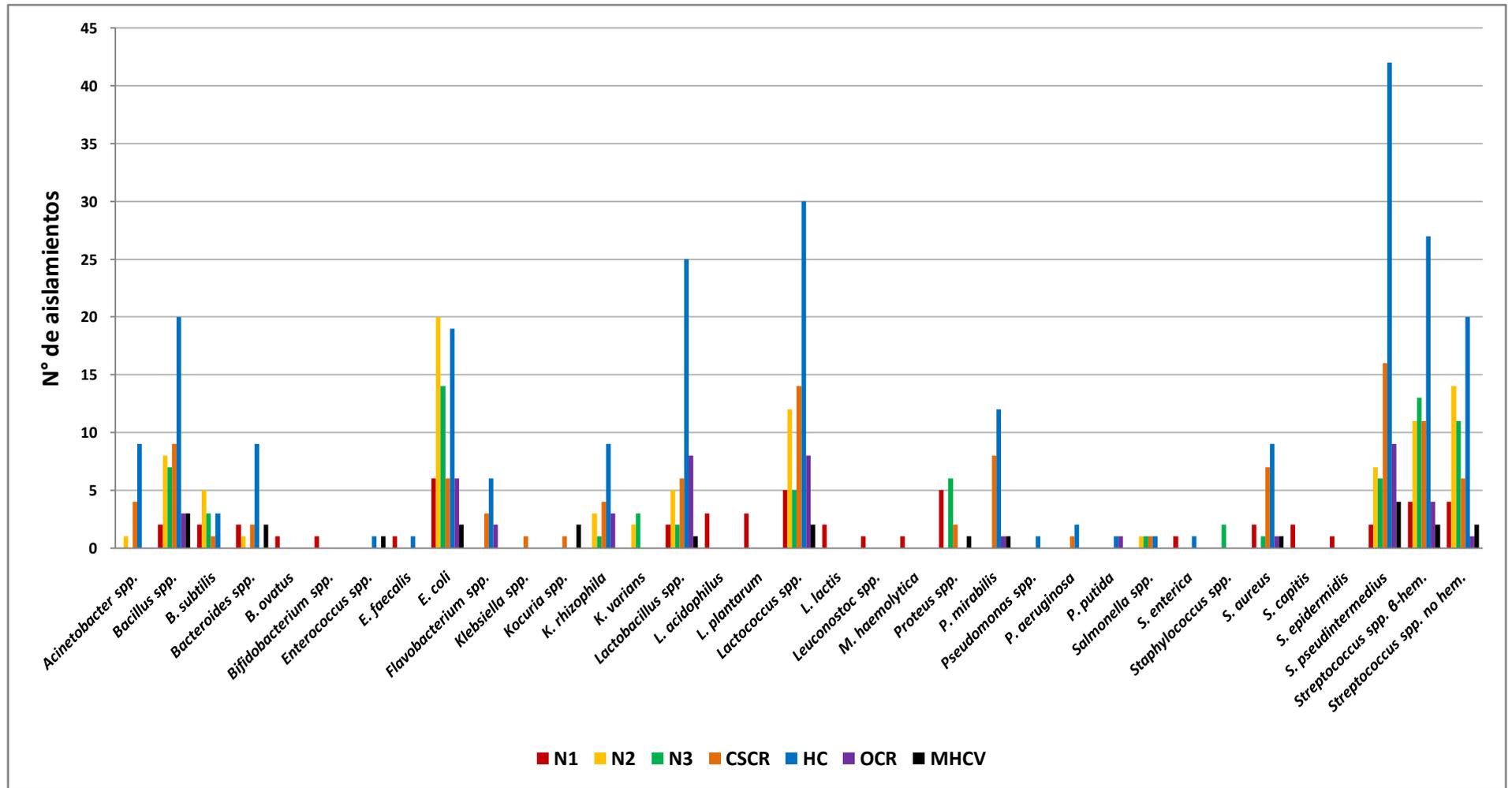


Figura 3. Recuento de los microorganismos en todos los grupos de estudio. Núcleo Zoológico 1-3: N1-N3; CSCR: Con Signos Clínicos Reproductivos; HC Hembras en celo; OCR: Otros Controles Reproductivos; MHCV: Machos del Hospital Clínico Veterinario.

2.2. Porcentaje de los microorganismos aislados según el tipo de respiración

En el total de animales analizados se obtuvieron 231 aislamientos de microorganismos aeróbicos (36,1%), 391 aislamientos de microorganismos anaeróbicos facultativos (61,1%) y 18 aislamientos de microorganismos anaeróbicos estrictos (2,8%) (Figura 4).

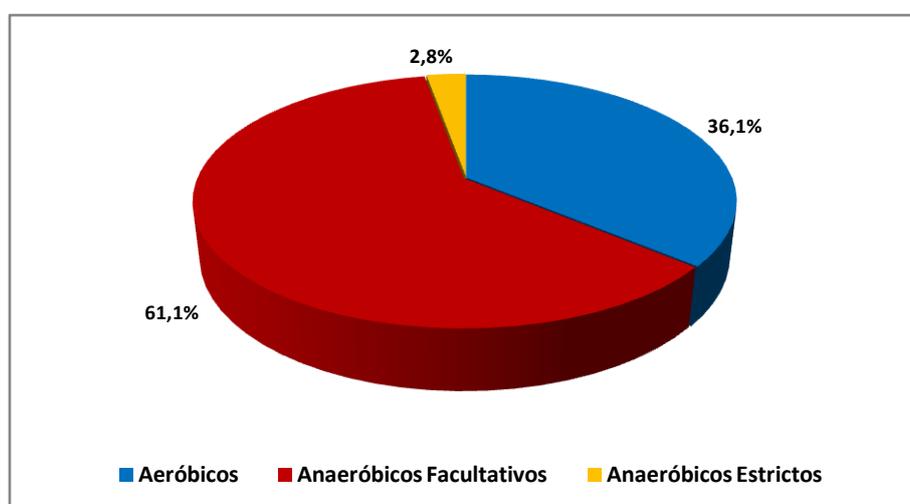


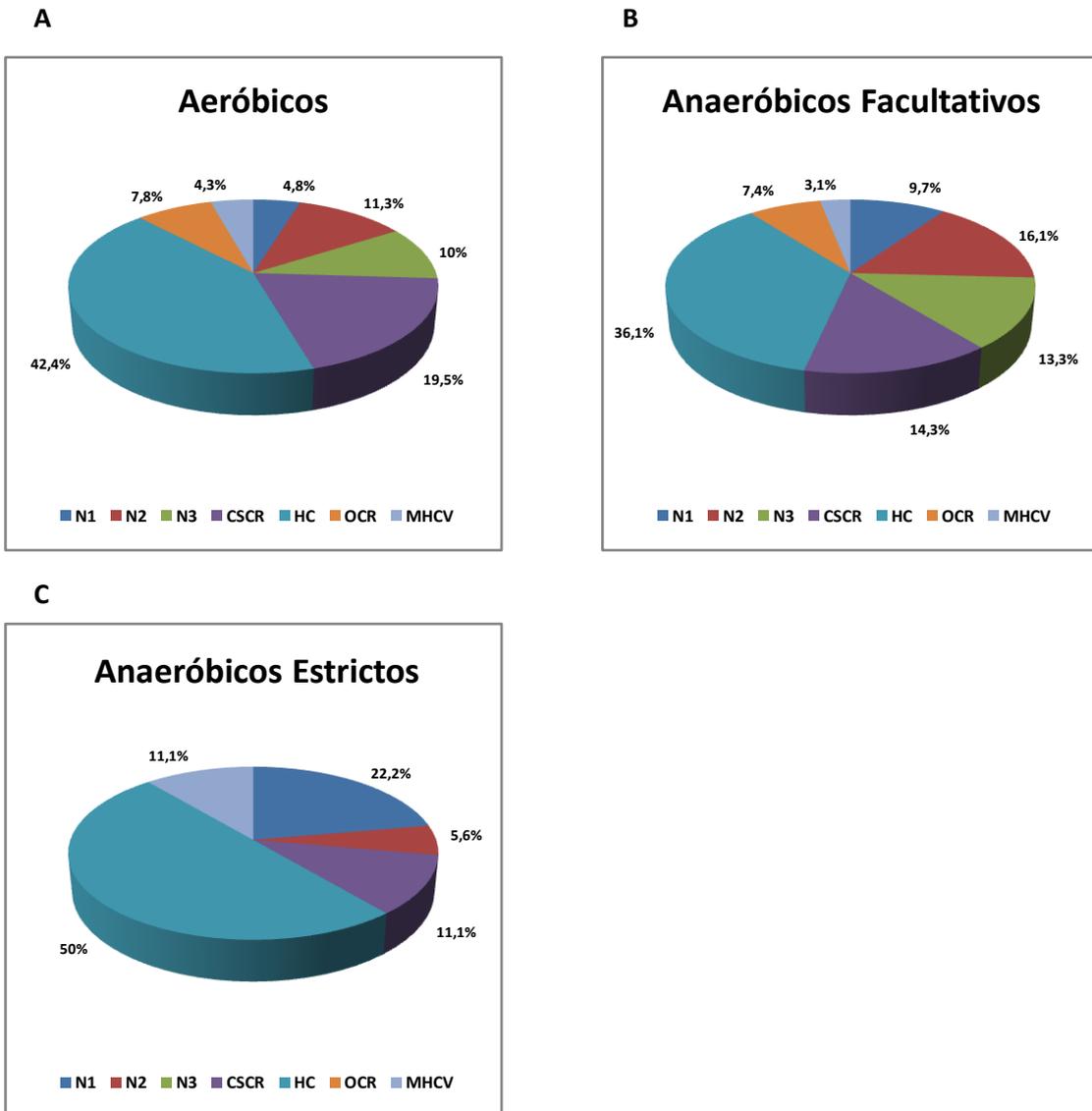
Figura 4. Porcentaje de microorganismos obtenidos en el total de los animales estudiados según el tipo de respiración.

De los 231 microorganismos aeróbicos aislados, 98 pertenecieron al grupo de HC (42,4%), 45 al grupo de hembras CSCR (19,5%), 26 al N2 (11,3%), 23 al N3 (10%), 18 al grupo de hembras para OCR (7,8%), 11 al N1 (4,8%) y, por último, 10 al grupo de MCHV (4,3%) (Figura 5A).

En cuanto a los 391 microorganismos anaeróbicos facultativos aislados, 141 procedieron del grupo de HC (36,1%), 63 del N2 (16,1%), 56 del grupo de hembras CSCR (14,3%), 52 del N3 (13,3%), 38 del N1 (9,7%), 29 del grupo de hembras para OCR (7,4%) y, por último, 12 del grupo de MCHV (3,1%) (Figura 5B).

Resultados

En el último grupo de respiración, anaeróbicos estrictos, no se obtuvieron aislamientos ni en el grupo de hembras para OCR ni en el N3. De los 18 microorganismos anaeróbicos estrictos, 9 pertenecieron al grupo de HC (50%), 4 al N1 (22,2%), 2 al grupo de hembras CSCR (11,1%), 2 al grupo de MCHV (11,1%) y 1 solo microorganismo al N2 (5,6%) (Figura 5C).



Figuras 5. Porcentajes de microorganismos aislados en los grupos de estudio según el tipo de respiración. A. Porcentaje de microorganismos aeróbicos; B. Porcentaje de microorganismos anaeróbicos facultativos; C. Porcentaje de microorganismos anaeróbicos estrictos.

El estudio estadístico de los porcentajes de aislamientos obtenidos entre los tres grupos de respiración microbiana (aeróbicos, anaeróbicos facultativos y anaeróbicos estrictos) indicó que no existían diferencias estadísticas significativas.

2.3. Porcentaje de cultivos axénicos y mixtos

En condiciones aeróbicas, se obtuvo de número promedio 3,7 especies bacterianas por muestra.

En estas condiciones de incubación se obtuvieron cultivos axénicos en 8 muestras (6%) y cultivos mixtos en 127 muestras (94%) (Figura 6). *Escherichia coli* fue la bacteria que se aisló con más frecuencia en cultivo axénico (en 6 muestras, conformando así el 75% de los cultivos axénicos) seguida de especies pertenecientes al género *Bacillus* (en 2 muestras, conformando el 25% de los cultivos axénicos).

En cuanto a los cultivos mixtos, se pueden destacar los formados por *Staphylococcus pseudintermedius* y *Escherichia coli* en 37 muestras (conformando el 29,1% de los cultivos mixtos obtenidos en condiciones aeróbicas), *S. pseudintermedius* y *Lactococcus* spp. en 33 muestras (26%), *S. pseudintermedius* y *Streptococcus* spp. β -hemolíticos en 30 muestras (23,6%), *Lactococcus* spp. y *E. coli* en 28 muestras (22%), *S. pseudintermedius* y *Streptococcus* spp. no hemolíticos en 26 muestras (20,5%), *S. pseudintermedius* y *Lactobacillus* spp. en 26 muestras (20,5%), *Streptococcus* spp. β -hemolíticos y *E. coli* en 25 muestras (19,7%) y *Streptococcus* spp. no hemolíticos y *E. coli* en 23 muestras (18,1%). Otros cultivos mixtos de interés obtenidos en condiciones aeróbicas fueron los formados por *Lactobacillus* spp. y *Lactococcus* spp. en 21 muestras (16,5%), *S. pseudintermedius* y bacterias del género *Proteus* en 21 muestras (16,5%), *Lactococcus* spp. y *Streptococcus* spp. no hemolíticos en 18 muestras (14,2%),

Lactococcus spp. y *Streptococcus* spp. β -hemolíticos en 17 muestras (13,4%) y *Lactobacillus* spp. y *E. coli* en 15 muestras (11,8%).

En condiciones anaeróbicas se obtuvo de número promedio 2,7 especies bacterianas por muestra.

Los cultivos axénicos obtenidos en condiciones anaeróbicas se obtuvieron en 22 muestras (16%) y en 106 de las muestras se obtuvieron cultivos mixtos (79%). En 7 de las muestras no se obtuvieron crecimientos (5%) (Figura 6). *E. coli* fue la bacteria aislada con más frecuencia en cultivo axénico, concretamente en 6 muestras (27,3% de los cultivos axénicos obtenidos en condiciones anaeróbicas), seguida de especies pertenecientes al género *Streptococcus* no hemolíticos en 5 muestras (22,7%), especies pertenecientes al género *Lactococcus* en 4 muestras (18,2%) y especies pertenecientes al género *Streptococcus* no hemolíticos en otras 4 muestras (18,2%). Otras bacterias aisladas en cultivo axénico en condiciones anaeróbicas fueron especies de los géneros *Proteus*, *Bacteroides* y *Bacillus* aisladas cada una en una muestra.

En cuanto a los cultivos mixtos, se pueden destacar los formados por *Streptococcus* spp. β -hemolíticos y *Lactococcus* spp. en 37 muestras (conformando el 34,9% de los cultivos mixtos en condiciones anaeróbicas), *Lactococcus* spp. y *Escherichia coli* en 30 muestras (28,3%), *Lactococcus* spp. y *Lactobacillus* spp. en 28 muestras (26,4%), *Streptococcus* spp. β -hemolíticos y *Lactobacillus* spp. en 21 muestras (19,8%), *Staphylococcus pseudintermedius* y *Lactococcus* spp. en otras 21 muestras (19,8%), *Streptococcus* spp. β -hemolíticos y *E. coli* en 20 muestras (18,9%). Otros cultivos mixtos de interés obtenidos en condiciones anaeróbicas fueron los formados por *Streptococcus* spp. no hemolíticos y *E. coli* en 15 muestras (14,2%), *Lactobacillus* spp. y *E. coli* en otras 15 muestras (14,2%), *Streptococcus* spp. β -hemolíticos y *S. pseudintermedius* en 14 muestras (13,2%), *Lactococcus* spp. y *Streptococcus* no hemolíticos en 13 muestras (12,3%), *S. pseudintermedius* y *Lactobacillus* spp. en otras 13 muestras

(12,3%) y *Streptococcus* spp. β -hemolíticos y bacterias del género *Proteus* en 11 muestras (10,4%).

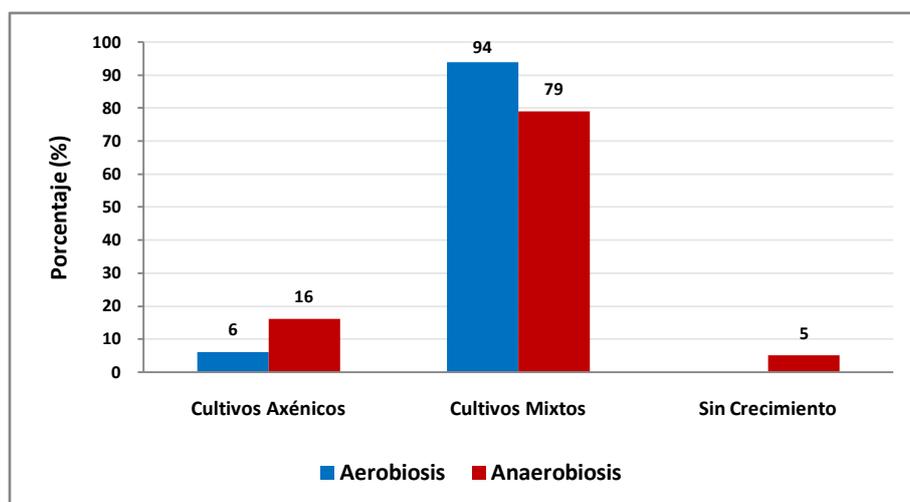


Figura 6. Porcentaje de cultivos axénicos y mixtos obtenidos en condiciones aeróbicas y anaeróbicas en la totalidad de los grupos de estudio.

2.4. Recuento de microorganismos en hembras

En hembras, en condiciones aeróbicas se obtuvo de número promedio 3,95 especies bacterianas (de 1 a 8 especies diferentes según la muestra) mientras que en condiciones anaeróbicas se obtuvo un número promedio de 2,8 especies bacterianas (de 0 a 7 especies diferentes según la muestra).

En el total de hembras analizadas se obtuvieron 192 aislamientos de microorganismos aeróbicos (38%), 306 aislamientos de microorganismos anaeróbicos facultativos (60%) y 1 aislamientos de microorganismos anaeróbicos estrictos (3%) (Figura 7).

Resultados

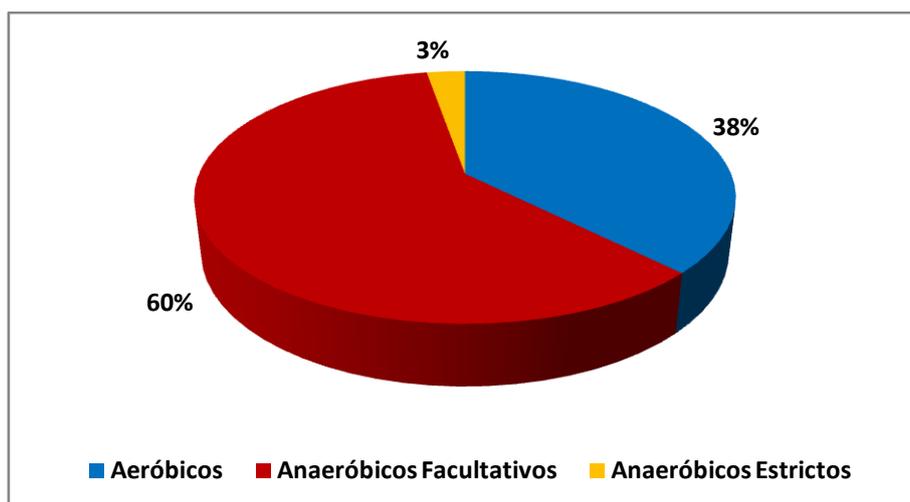


Figura 7. Porcentaje de microorganismos obtenidos en las hembras del estudio según el tipo de respiración.

El estudio estadístico realizado para comparar los porcentajes obtenidos de cada tipo de respiración entre los grupos de hembras castradas (Núcleos Zoológicos) y hembras enteras (Hospital Clínico Veterinario) indicó que existían diferencias significativas ($P < 0,05$) en los aislamientos de microorganismos aeróbicos (84% de aislamientos en hembras no castradas y 16% en hembras castradas) y anaeróbicos facultativos (74% de aislamientos en hembras no castradas y 26% en hembras castradas) (Figura 8A, B y C).

Resultados

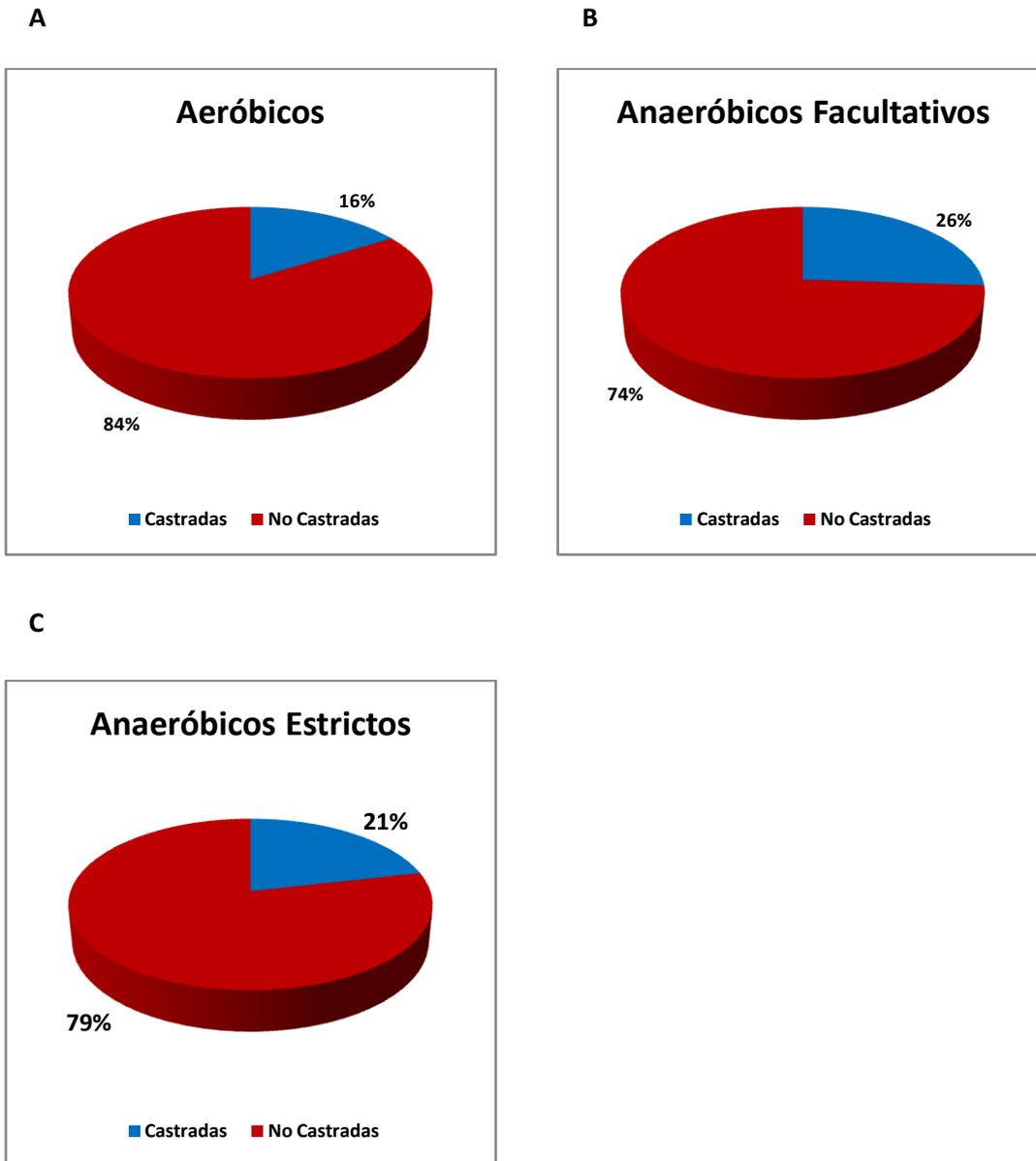


Figura 8. Porcentaje de microorganismos obtenidos en las hembras castradas (Núcleos Zoológicos) y no castradas (grupos del Hospital Clínico Veterinario) según el tipo de respiración. A. Porcentaje de microorganismos aeróbicos; B. Porcentaje de microorganismos anaeróbicos facultativos; C. Porcentaje de microorganismos anaeróbicos estrictos.

En el estudio estadístico de los porcentajes obtenidos de cada tipo de respiración entre las hembras de los diferentes grupos si se observan diferencias significativas ($P < 0,05$). Centrándonos en el porcentaje de microorganismos aeróbicos, se observan diferencias significativas entre las hembras del N1 y las hembras CSCR. El porcentaje de microorganismos aeróbicos de las hembras CSCR correspondió al 23% de los aislamientos, mientras que en el N1 correspondió al 2% de los aislamientos totales (Figura 9A). En cuanto al porcentaje de microorganismos anaeróbicos facultativos se observaron diferencias significativas entre las hembras CSCR y el las hembras del N3. El porcentaje de microorganismos anaeróbicos facultativos del N3 correspondió al 9% de los aislamientos totales, mientras que en las hembras CSCR correspondió al 18% de los aislamientos (Figura 9B). Por último, en el porcentaje de microorganismos anaeróbicos estrictos se observaron diferencias significativas entre el N1 y el resto de grupos. El porcentaje de microorganismos anaeróbicos estrictos del N1 correspondió a un 21% de los aislamientos totales, mientras que para las HC y hembras CSCR correspondió un 64% y 14% respectivamente y un 0% tanto para las hembras del N2 como las del N3 (Figura 9C).

Resultados

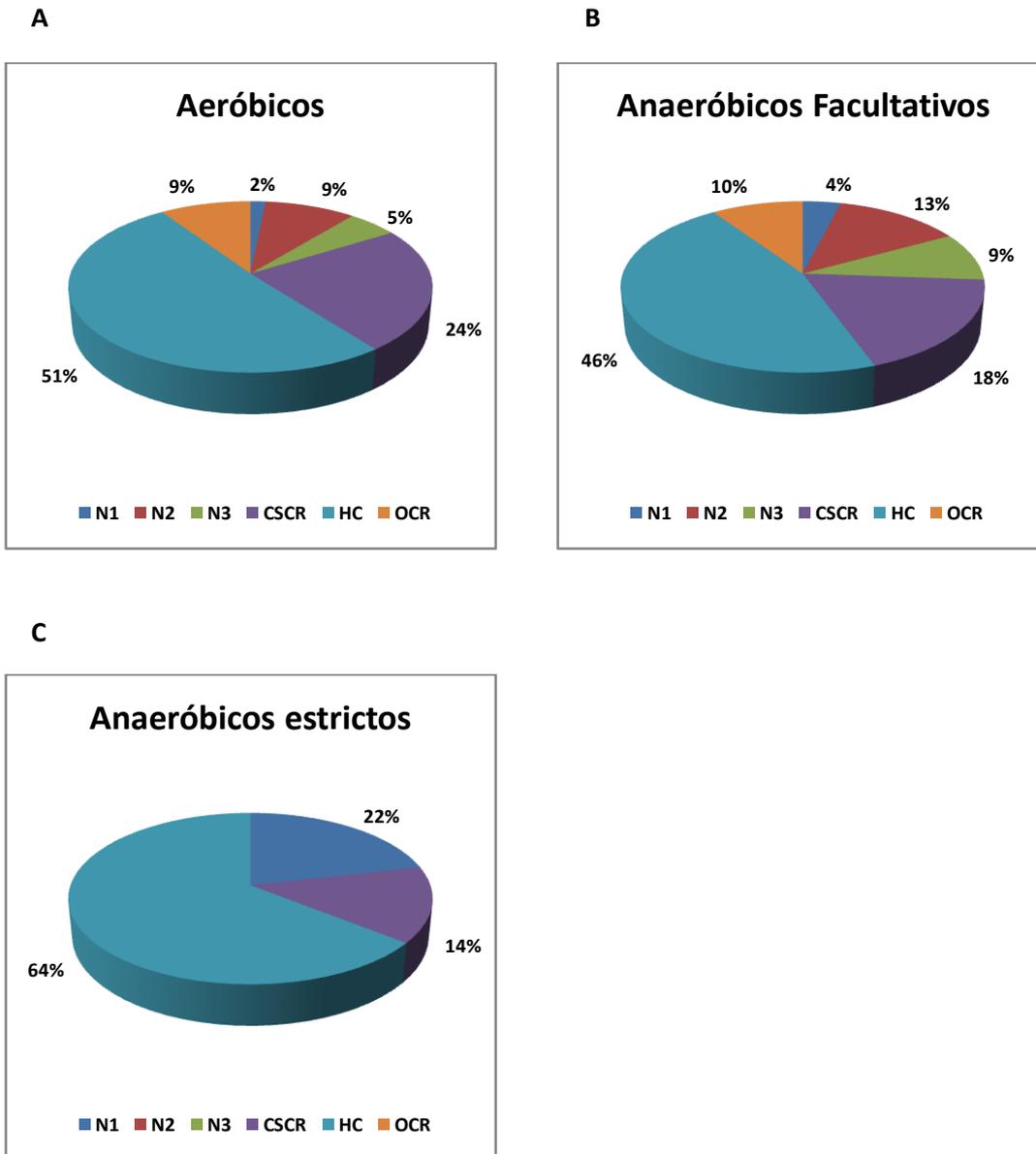


Figura 9. Porcentaje de microorganismos obtenidos en las hembras de los diferentes grupos de estudio según el tipo de respiración.

A. Porcentaje de microorganismos aeróbicos; B. Porcentaje de microorganismos anaeróbicos facultativos; C. Porcentaje de microorganismos anaeróbicos estrictos.

De los 512 aislamientos obtenidos en todas las perras se observó que *Staphylococcus pseudintermedius* fue el microorganismo que se aisló con más frecuencia con un total de 73 aislamientos (14,3% del total). *Lactococcus* spp. fue la segunda bacteria aislada con mayor frecuencia, en un total de 64 aislamientos (12,5%), seguida de *Streptococcus* spp. β -hemolíticos con 56 aislamientos (10,9%), *Escherichia coli* con 52 aislamientos (10,2%), *Lactobacillus* spp. con 45 aislamientos (8,8%), *Bacillus* spp. con 43 aislamientos (8,4%) y *Streptococcus* spp. no hemolíticos con otros 43 aislamientos (8,4%) (Figura 10).

Las combinaciones microbianas más frecuentes aisladas en cultivo mixto en condiciones aeróbicas fueron las formadas por *Lactococcus* spp. y *Staphylococcus pseudintermedius* (32% de los cultivos mixtos en hembras), *Staphylococcus pseudintermedius* y *E. coli* (30%) y *Staphylococcus pseudintermedius* y *Streptococcus* spp. β -hemolíticos (27%). En condiciones anaeróbicas, las combinaciones microbianas más frecuentes en cultivo mixto fueron las formadas por *Lactococcus* spp. y *Streptococcus* spp. β -hemolíticos (35,6% de los cultivos mixtos en hembras), *Lactococcus* spp. y *E. coli* (29,9%) y *Lactococcus* spp. y *Lactobacillus* spp. (28,7%).

Si separamos los aislamientos en cada uno de los grupos de estudio, como se representa en la Figura 11, observamos que en el Núcleo Zoológico 1 los microorganismos predominantes fueron *E. coli*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus* spp. y *Staphylococcus aureus* con un total de 2 aislamientos cada uno (0,4% de los aislamientos totales en hembras). En el Núcleo Zoológico 2 se observó que el microorganismo predominante fue *E. coli* con un total de 12 aislamientos (2,3% de los aislamientos totales en hembras) seguidos de *Streptococcus* spp. no hemolíticos con un total de 10 aislamientos (1,95%), *Streptococcus* spp. β -hemolíticos con un total de 7 aislamientos (1,36%) y *Lactococcus* spp. con otros 7 aislamientos (1,36%). En cuanto al último Núcleo Zoológico, N3, el microorganismo predominante fue *E. coli* con un total de 7 aislamientos (1,36% de los aislamientos totales en hembras) seguido de *Bacillus* spp. con 6 aislamientos (1,2%), *Streptococcus* spp. β -hemolíticos con

otros 6 aislamientos (1,2%) y *Streptococcus* spp. no hemolíticos con 5 aislamientos (0,97%) (Figura 11).

Los grupos CSCR, HC y OCR están formados exclusivamente por hembras. En las perras CSCR, el microorganismo predominante fue *Staphylococcus pseudintermedius* con 16 aislamientos (3,1% de los aislamientos totales en hembras), seguido de *Lactococcus* spp. con 14 aislamientos (2,7%), *Streptococcus* spp. β -hemolíticos con 11 aislamientos (2,1%), *Bacillus* spp. con 9 aislamientos (1,75%), *Proteus mirabilis* con 8 aislamientos (1,56%) y *Staphylococcus aureus* con 7 aislamientos (1,36%).

En el grupo de HC, *S. pseudintermedius* fue el microorganismo predominante con 42 aislamientos (8,2% de los aislamientos totales en hembras) seguido de *Lactococcus* spp. con 30 aislamientos (5,85%), *Streptococcus* spp. β -hemolítico con 27 aislamientos (5,3%), *Lactobacillus* spp. con 25 aislamientos (4,9%), *Bacillus* spp. con 20 aislamientos (3,9%), *Streptococcus* spp. no hemolíticos con otros 20 aislamientos (3,9%) y *Escherichia coli* con 19 aislamientos (3,7%). Por último, en el grupo de hembras para OCR el microorganismo predominante fue *Staphylococcus pseudintermedius* con 9 aislamientos (1,75% de los aislamientos totales en hembras) seguido de *Lactobacillus* spp. con 8 aislamientos (1,56%), *Lactococcus* spp. con otros 8 aislamientos (1,56%), *E. coli* con 6 aislamientos (1,17%) y *Streptococcus* spp. β -hemolíticos con 4 aislamientos (0,8%).

Resultados

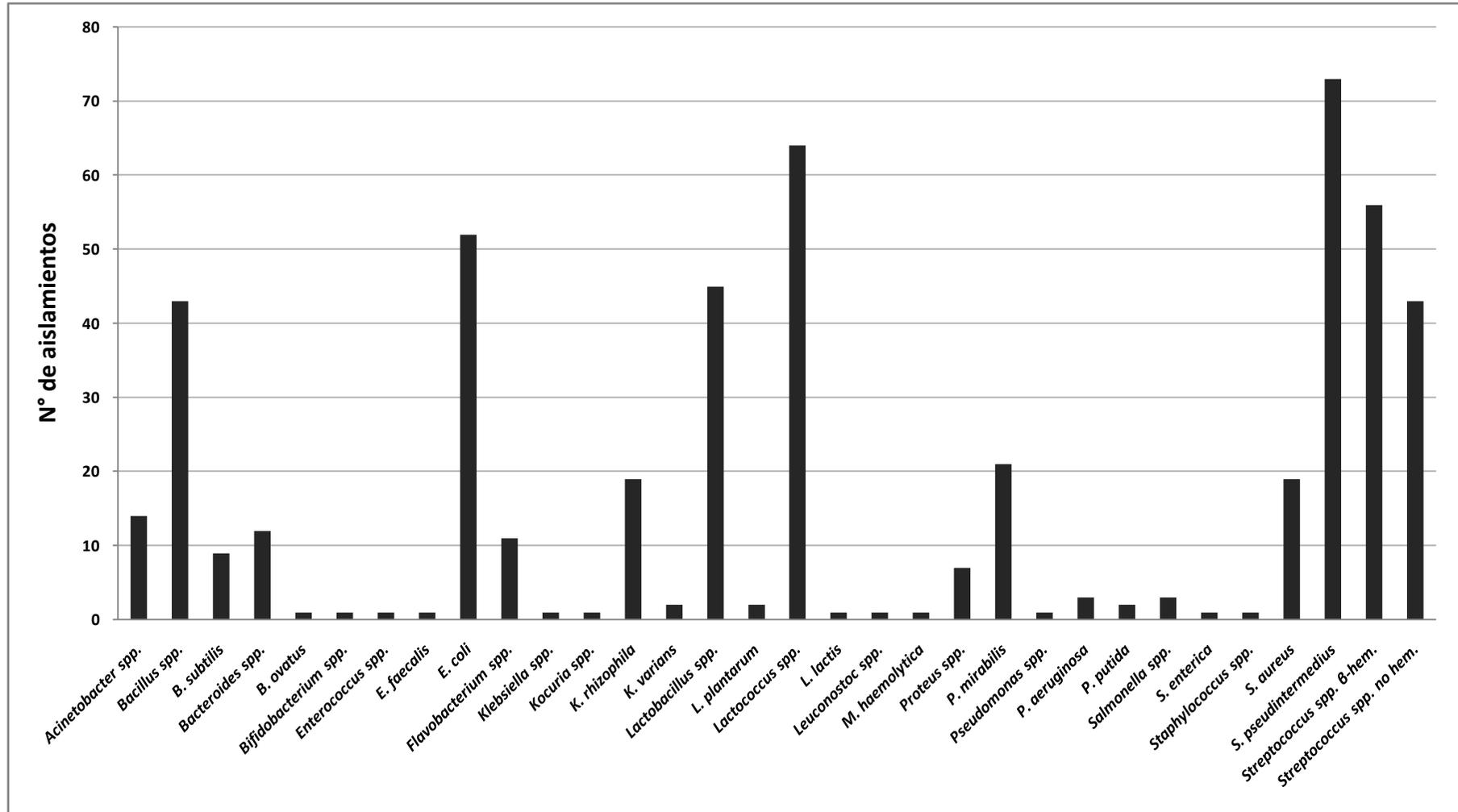


Figura 10. Número de aislamientos de los microorganismos obtenidos en las hembras de nuestro estudio.

Resultados

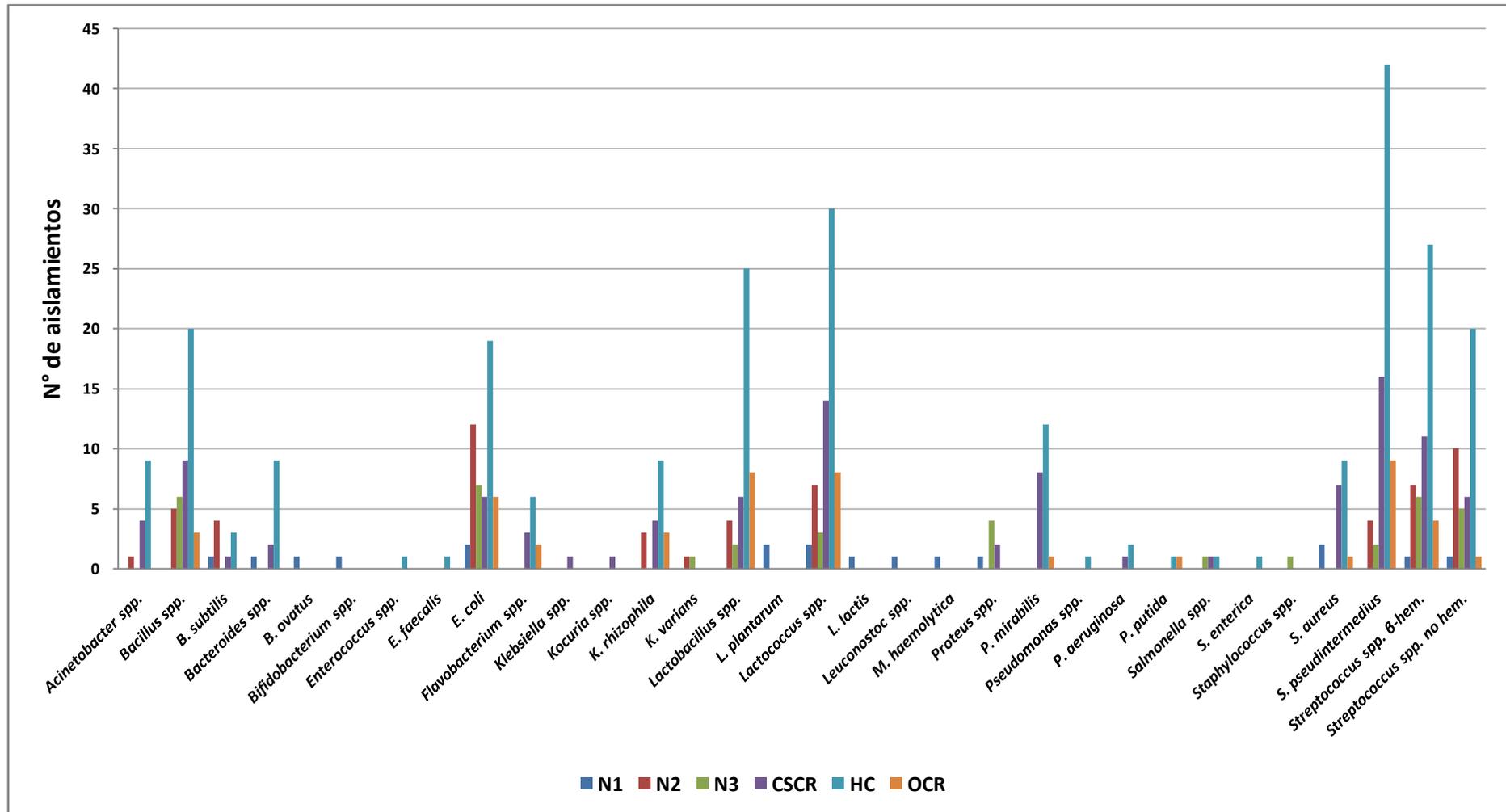


Figura 11. Recuento de los microorganismos aislados en el total de hembras estudiadas. Núcleo Zoológico 1-3: N1-N3; CSCR: Con Signos Clínicos Reproductivos; HC: Hembras en Celo; OCR: Otros Controles Reproductivos.

2.5. Recuento de microorganismos en los machos

En machos, en condiciones aeróbicas, se obtuvo de número promedio 3 especies bacterianas (de 1 a 6 especies diferentes según la muestra) mientras que en condiciones anaeróbicas se obtuvo un número promedio de 2,1 especies bacterianas (de 1 a 4 especies diferentes según la muestra).

En el total de machos analizados se obtuvieron 39 aislamientos de microorganismos aeróbicos (30%), 85 aislamientos de microorganismos anaeróbicos facultativos (66%) y 4 aislamientos de microorganismos anaeróbicos estrictos (3%) (Figura 12).

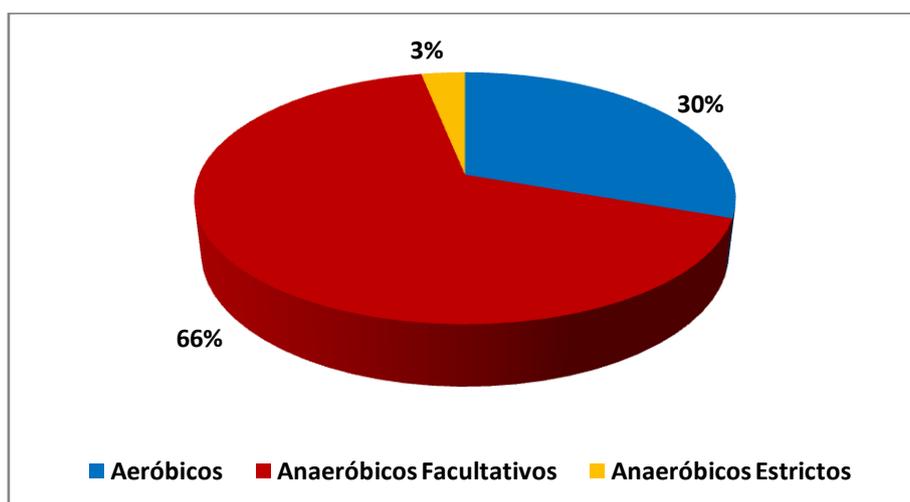


Figura 12. Porcentaje de microorganismos obtenidos en los machos del estudio según el tipo de respiración.

El estudio estadístico realizado para comparar los porcentajes obtenidos de cada tipo de respiración entre los grupos de machos castrados (Núcleos Zoológicos) y machos enteros (Hospital Clínico Veterinario) indicó que no existían diferencias significativas ($P>0,05$) en ninguno de los grupos de respiración (Figura 13A, B y C).

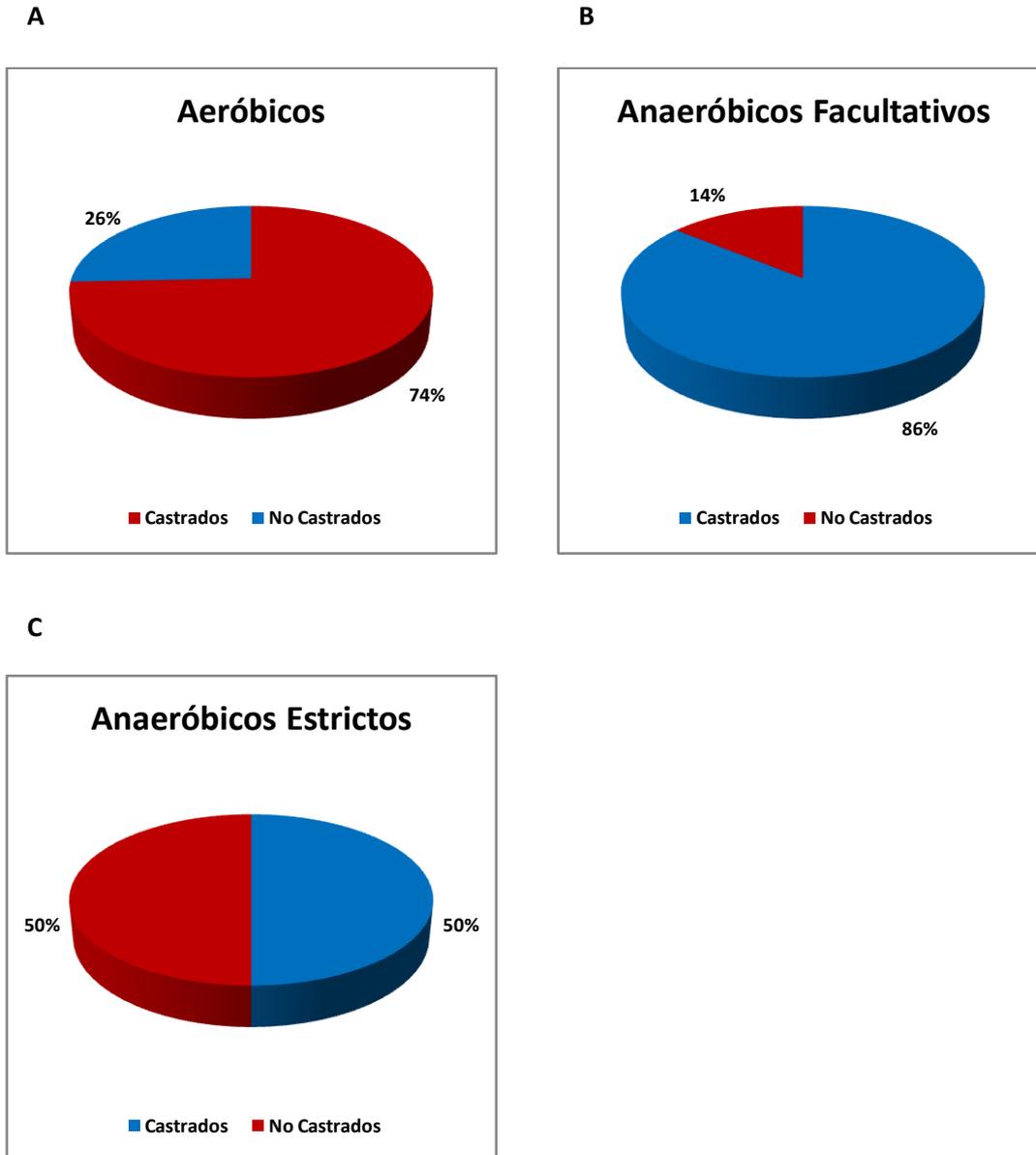


Figura 13. Porcentaje de microorganismos obtenidos en los machos castrados (Núcleos Zoológicos) y no castrados (grupo del Hospital Clínico Veterinario) según el tipo de respiración. A. Porcentaje de microorganismos aeróbicos; B. Porcentaje de microorganismos anaeróbicos facultativos; C. Porcentaje de microorganismos anaeróbicos estrictos.

Resultados

El estudio estadístico realizado para comparar los porcentajes obtenidos de cada tipo de respiración entre los diferentes grupos de machos indicó que no existían diferencias significativas ($P > 0,05$) (Figura 14A, B y C).

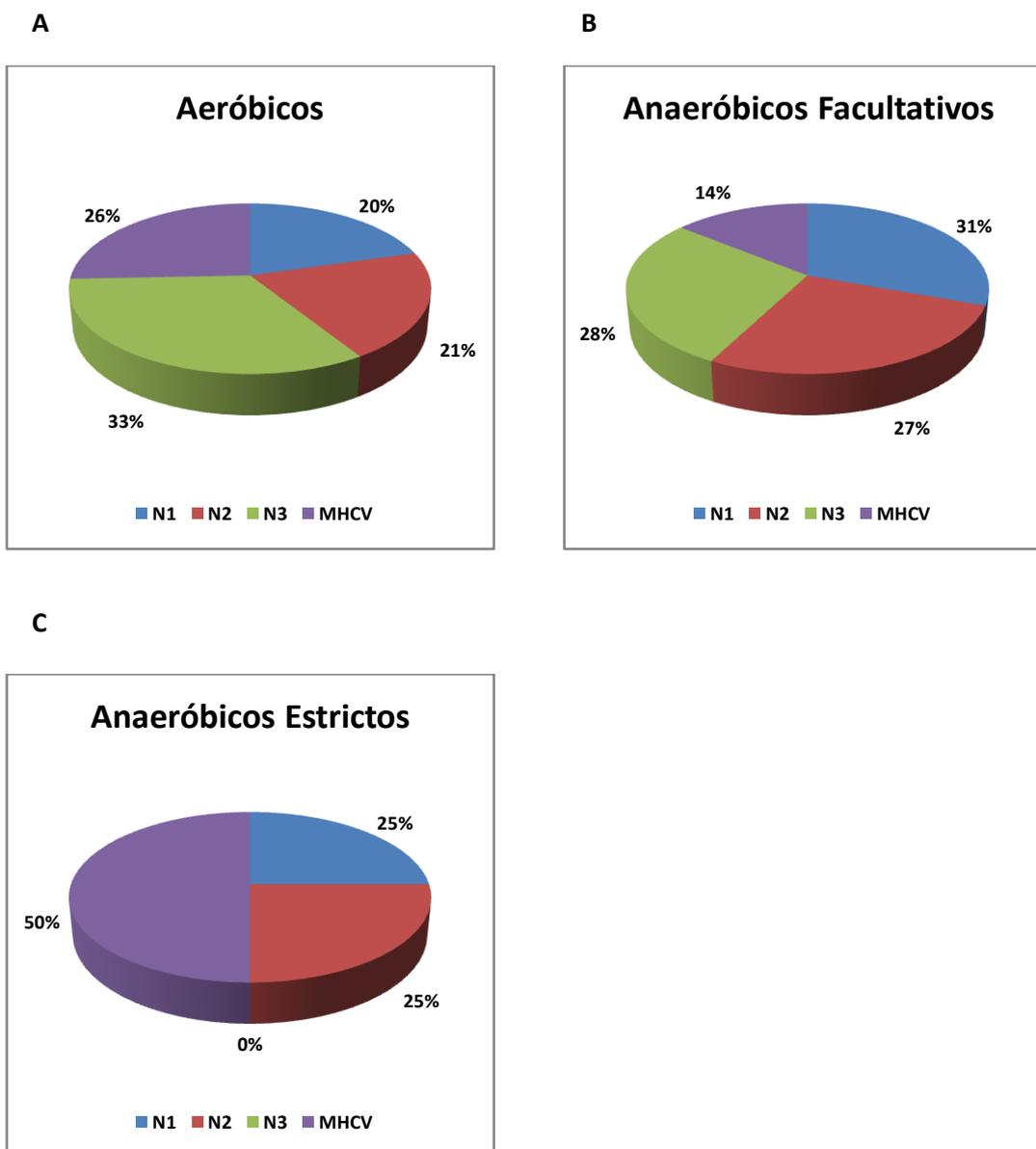


Figura 14. Porcentaje de microorganismos obtenidos en los diferentes grupos de machos según el tipo de respiración.

A. Porcentaje de microorganismos aeróbicos; B. Porcentaje de microorganismos anaeróbicos facultativos; C. Porcentaje de microorganismos anaeróbicos estrictos.

En comparación con las muestras vaginales, en las muestras prepuciales se obtuvieron menos aislamientos y menos diversidad microbiana. De los 128 aislamientos totales obtenidos en perros, el microorganismo que se aisló con más frecuencia fue *Escherichia coli* con un total de 21 aislamientos (16,4% de los aislamientos totales en machos), seguido de *Streptococcus* spp. β -hemolíticos con 16 aislamientos (12,5%), *Streptococcus* spp. no hemolíticos con 15 aislamientos (11,7%), *Staphylococcus pseudintermedius* con 13 aislamientos (10,15%) y *Lactococcus* spp. con 12 aislamientos (9,4%) (Figura 15). Las combinaciones microbianas más frecuentes aisladas en cultivo mixto en condiciones aeróbicas fueron las formadas por *Streptococcus* spp. β -hemolíticos y *Escherichia coli* (33,3% de los cultivos mixtos en machos) y *S. pseudintermedius* y *E. coli* (25,9%). En condiciones anaeróbicas, las combinaciones microbianas más frecuentes en cultivo mixto fueron las formadas por *Lactococcus* spp. y *Streptococcus* spp. β -hemolíticos (31,6% de los cultivos mixtos en machos y *Lactococcus* spp. y *E. coli* (21,1%).

El estudio estadístico realizado para comparar los porcentajes obtenidos de cada tipo de respiración entre los grupos de machos castrados (Núcleos Zoológicos) y machos enteros (MHCV) no mostró diferencias estadísticas significativas en los porcentajes obtenidos.

Si separamos los aislamientos en cada uno de los grupos de estudio, como se representa en la Figura 16, observamos que en el Núcleo Zoológico 1 los microorganismos predominantes fueron *Proteus* spp. y *E. coli* con un total de 4 aislamientos cada uno (3,1% de los aislamientos totales en machos), seguidos de *Lactococcus* spp., *Lactococcus acidophilus*, *Streptococcus* spp. β -hemolíticos y *Streptococcus* spp. no hemolíticos con 3 aislamientos para cada microorganismo (2,34%).

En el Núcleo Zoológico 2, el microorganismo predominante fue *E. coli* con un total de 8 aislamientos (6,25% de los aislamientos totales en machos), seguido de *Lactococcus* spp. con 5 aislamientos (3,9%), *Streptococcus* spp. β -hemolíticos con 4 aislamientos (3,1%) y *Streptococcus* spp. no hemolíticos con otros 4 aislamientos (3,1%).

Resultados

En cuanto al último Núcleo Zoológico, N3, los microorganismos predominantes fueron *Streptococcus* spp. β -hemolíticos y *E. coli* con un total de 7 aislamientos cada uno (5,46% de los aislamientos totales en machos) seguidos de *Streptococcus* spp. no hemolíticos con 6 aislamientos (4,7%).

Por último, en el grupo de MHCV el microorganismo aislado con más frecuencia fue *S. pseudintermedius* con 4 aislamientos (3,1% de los aislamientos totales en machos) seguido de *Bacillus* spp. con 3 aislamientos (2.3%) (Figura 16).

Resultados

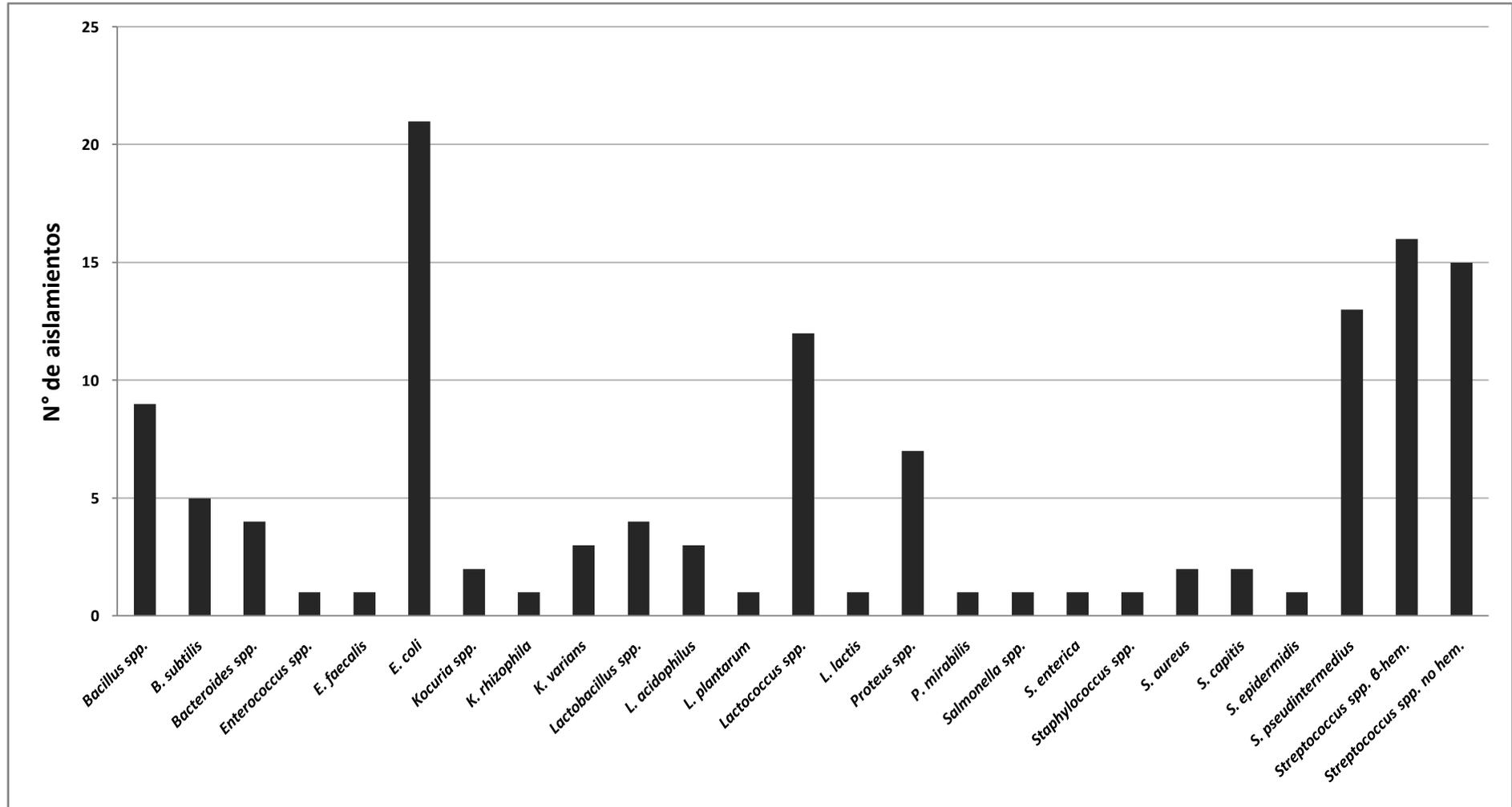


Figura 15. Número de aislamientos de los microorganismos aislados en la totalidad de machos del estudio.

Resultados

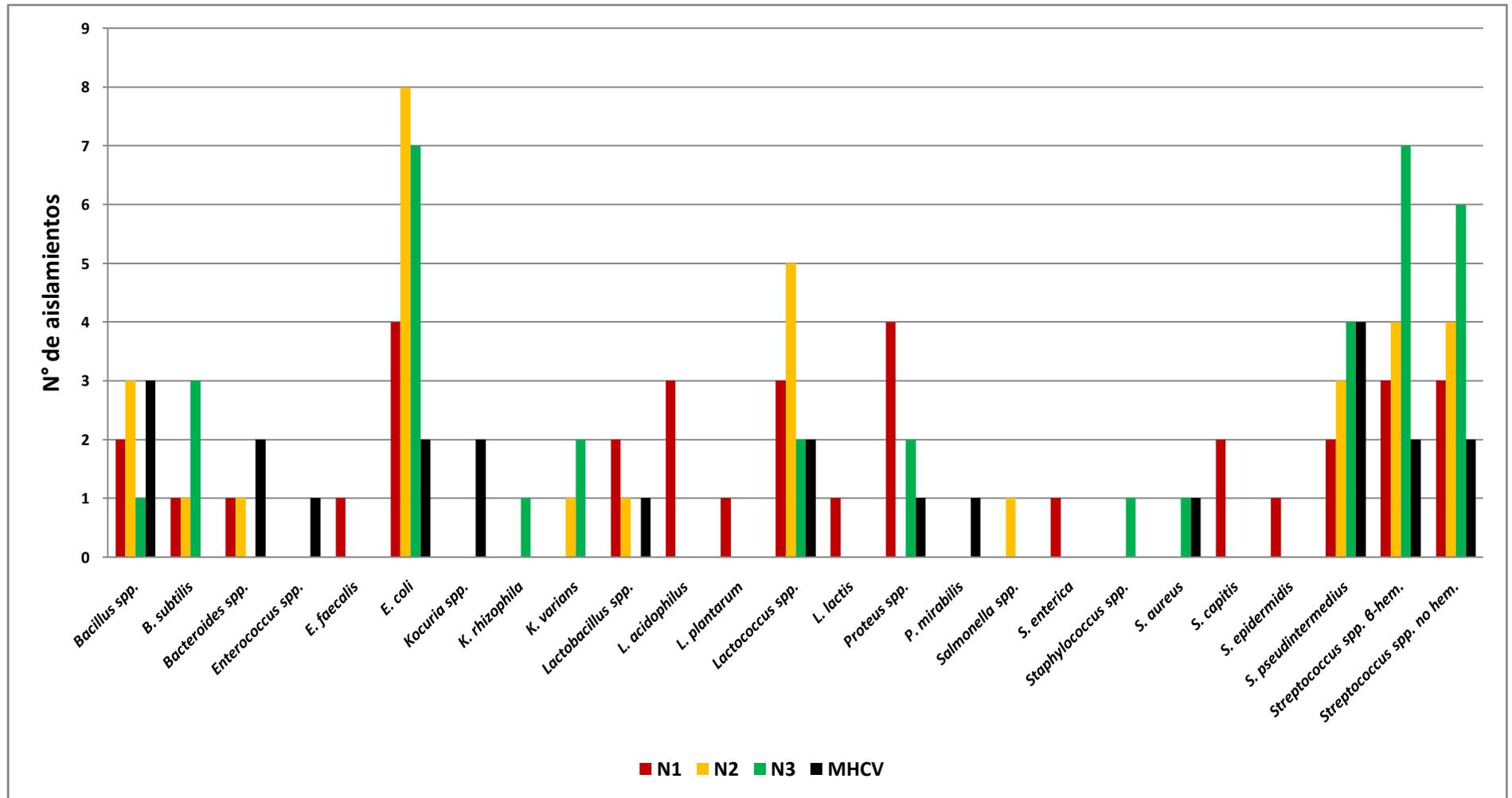


Figura 16. Recuento de los microorganismos en los machos totales. Núcleo Zoológico 1-3: N1-N3; MHCV: Machos del Hospital Clínico Veterinario.

3. Estudio descriptivo de la microbiota genital en los Núcleos Zoológicos

3.1. Resultados de los recuentos microbianos

En los Núcleos Zoológicos se obtuvieron un total de 218 aislamientos: 53 aislamientos en el N1, 90 aislamientos en el N2 y 75 aislamientos en el N3.

En los aislamientos obtenidos se observó que *Escherichia coli* fue el microorganismo más frecuente con 40 aislamientos (18,3% de los aislamientos totales en los núcleos zoológicos), seguido de *Streptococcus* spp. no hemolíticos con 29 aislamientos (13,3%), *Streptococcus* spp. β -hemolíticos con 28 aislamientos (12,8%), *Lactococcus* spp. con 22 aislamientos (10,1%), *Bacillus* spp. con 17 aislamientos (7,8%), *Staphylococcus pseudintermedius* con 15 aislamientos (6,9%) y *Proteus* spp. con 11 aislamientos (5%) (Figura 17).

El estudio estadístico realizado para comparar los porcentajes de aislamientos de cada especie microbiana obtenidos indicó que, a excepción de tres casos, no existían diferencias significativas entre las bacterias aisladas en cada núcleo zoológico.

En los porcentajes de aislamientos entre el N1 y los dos Núcleos Zoológicos restantes se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en el aislamiento de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus plantarum*. Los porcentajes obtenidos en el N1 correspondieron cada uno a un 5,7% de los aislamientos totales, mientras que en los otros dos Núcleos Zoológicos no se consiguieron aislar estas especies microbianas (Figura 18).

Resultados

En cuanto al aislamiento de *Proteus* spp. no se observaron diferencias significativas entre el N1 y el N3 pero sí se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre estos dos núcleos y el N2. El aislamiento de *Proteus* spp. dentro del N1 correspondió al 9,4% de los aislamientos y en el N3 al 8%, mientras que en el N2 no se obtuvieron aislamientos (Figura 18).

Resultados

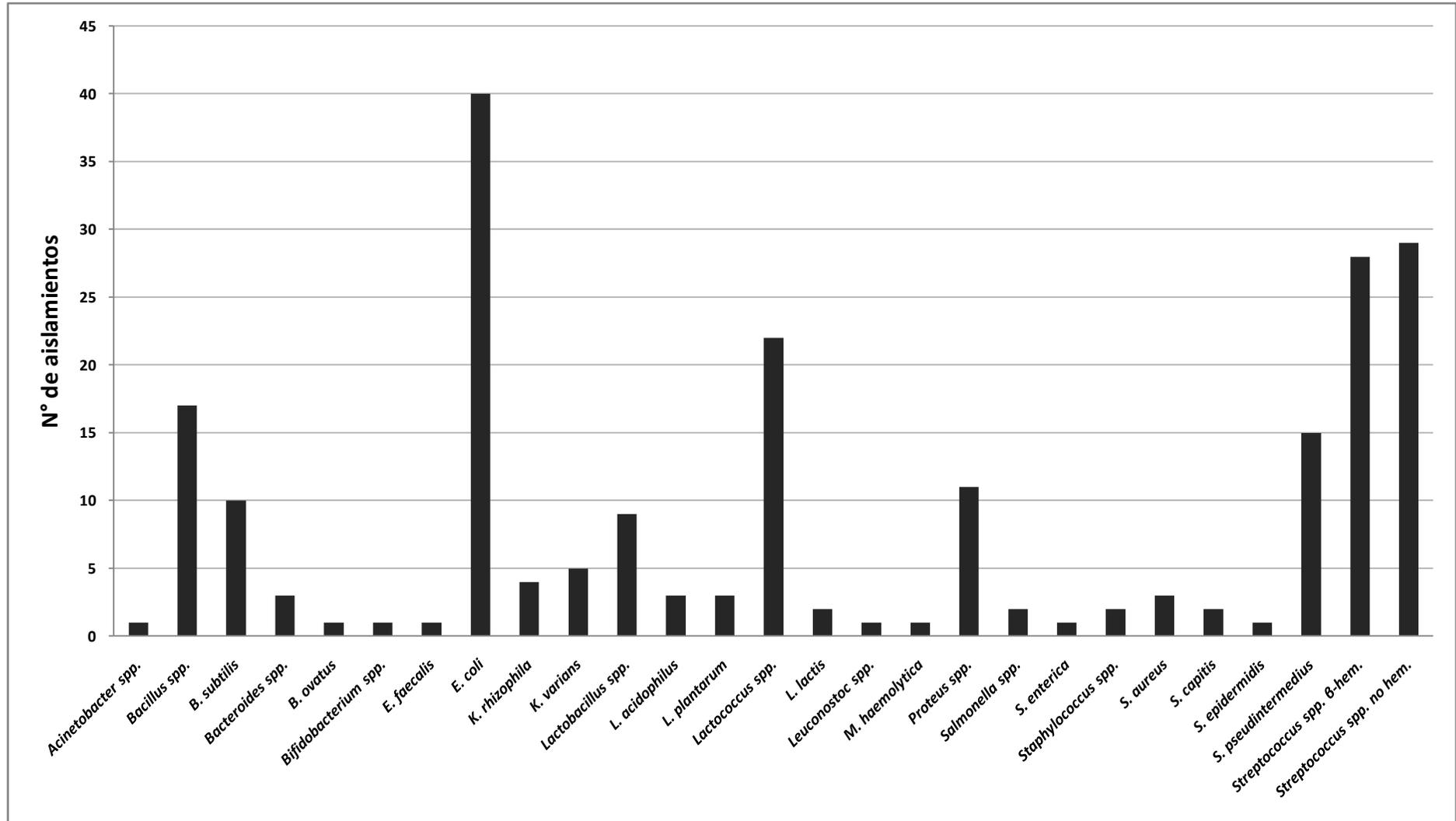


Figura 17. Recuento de los microorganismos totales en los Núcleos Zoológicos.

Resultados

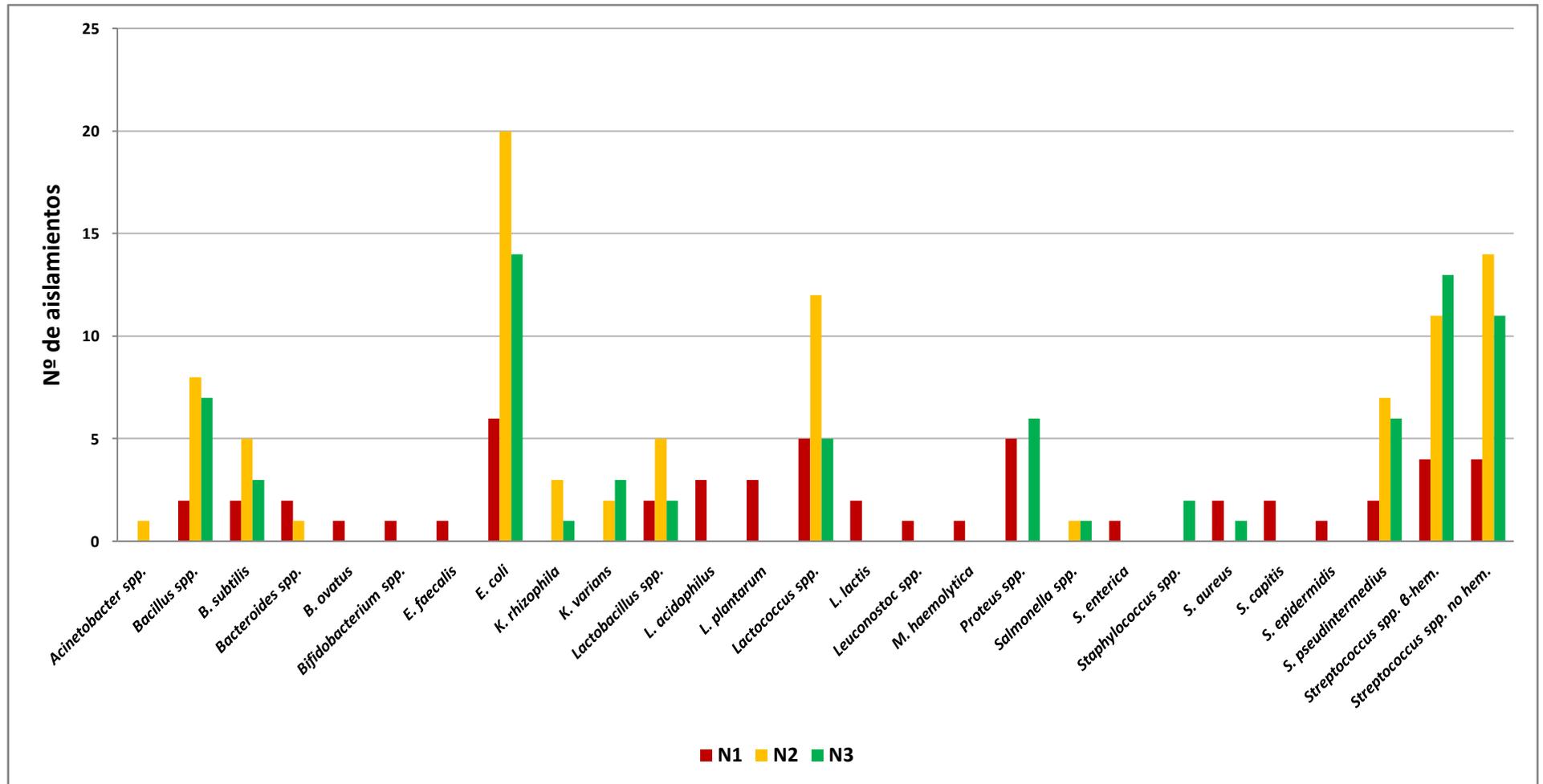


Figura 18. Recuento de los microorganismos totales en los Núcleos Zoológicos. (Núcleo Zoológico 1-3: N1-N3).

3.2. Porcentaje de microorganismos según el tipo de respiración

En la totalidad de los Núcleos Zoológicos se obtuvieron 60 aislamientos de microorganismos aeróbicos (27,5%), 153 aislamientos de microorganismos anaeróbicos facultativos (70,2%) y 5 aislamientos de microorganismos anaeróbicos estrictos (2,3%) (Figura 19).

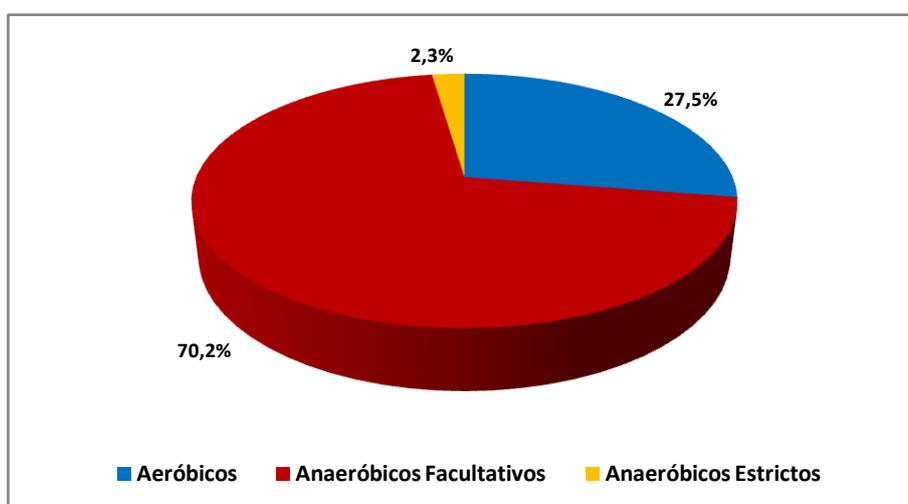


Figura 19. Porcentaje de microorganismos obtenidos en los Núcleos Zoológicos según el tipo de respiración.

El estudio estadístico realizado para comparar los porcentajes obtenidos de cada tipo de respiración indicó que no existían diferencias significativas entre núcleos, ni entre las hembras y machos dentro de un mismo Núcleo Zoológico.

3.3. Porcentaje de cultivos axénicos y mixtos

En los Núcleos Zoológicos en condiciones aeróbicas, se obtuvo de número promedio 3,1 especies bacterianas (de 1 a 8 especies diferentes según la muestra) mientras que en condiciones anaeróbicas se obtuvo un número promedio de 2,3 especies bacterianas (de 0 a 5 especies diferentes según la muestra).

En condiciones aeróbicas se obtuvieron cultivos axénicos en 6 muestras (12%) y cultivos mixtos en 44 muestras (88%) (Figura 20).

Escherichia coli fue el microorganismo que se aisló con más frecuencia en cultivo axénico, concretamente en 4 muestras (66,6% de los cultivos axénicos aeróbicos), seguido de especies pertenecientes al género *Bacillus* que se aislaron en 2 muestras (33,3% de los cultivos axénicos aeróbicos).

En cuanto a las combinaciones de bacterias más frecuentes obtenidas en los cultivos mixtos, estuvieron formadas por *Streptococcus* spp. β -hemolíticos y *E. coli* en 14 muestras (31,8% de los cultivos mixtos obtenidos en condiciones aeróbicas en los Núcleos Zoológicos) seguidos por *Streptococcus* spp. no hemolíticos y *E. coli* en 13 muestras (29,5%), *Staphylococcus pseudintermedius* y *E. coli* en 10 muestras (22,7%), *Lactococcus* spp. y *E. coli* en 8 muestras (18,2%), *Streptococcus* spp. no hemolíticos y *Streptococcus* spp. β -hemolíticos en 5 muestras (11,4%), *Streptococcus* spp. no hemolíticos y *S. pseudintermedius* en 5 muestras (11,4%) y *Lactococcus* spp. y *Streptococcus* spp. no hemolíticos en otras 5 muestras (11,4%).

Los cultivos axénicos obtenidos en condiciones anaeróbicas se obtuvieron en 14 muestras (28%) y en 34 muestras se obtuvieron cultivos mixtos (68%), mientras que en 2 muestras no se obtuvieron crecimientos (4%) (Figura 20).

Escherichia coli fue el microorganismo aislado en cultivo axénico con más frecuencia, estando presente en 5 muestras (35,7% de los cultivos axénicos anaeróbicos), seguido de especies del género *Streptococcus* no hemolíticos en 3 muestras (21,4%), especies del género *Lactococcus* en 2 muestras (14,3%), especies del género *Streptococcus* β -hemolíticos en otras 2 muestras (14,3%) y especies del género *Bacillus* y *Proteus* en 1 muestra respectivamente (7,14%).

En cuanto a las combinaciones de bacterias más frecuentes obtenidas en los cultivos mixtos estuvieron formadas por *Streptococcus* spp. no hemolíticos y *E. coli* en 11 muestras (32,4% de los cultivos mixtos obtenidos en condiciones anaeróbicas en los Núcleos Zoológicos) seguidas por *Lactococcus* spp. y

Streptococcus spp. β -hemolíticos en 10 muestras (29,4%), *Streptococcus* spp. β -hemolíticos y *E. coli* en 9 muestras (26,5%), *Streptococcus* spp. no hemolíticos y *Streptococcus* spp. β -hemolíticos en 8 muestras (23,5%), *Lactococcus* spp. y *Streptococcus* spp. no hemolíticos en 7 muestras (20,6%) y *Lactococcus* spp. y *E. coli* en otras 7 muestras (20,6%).

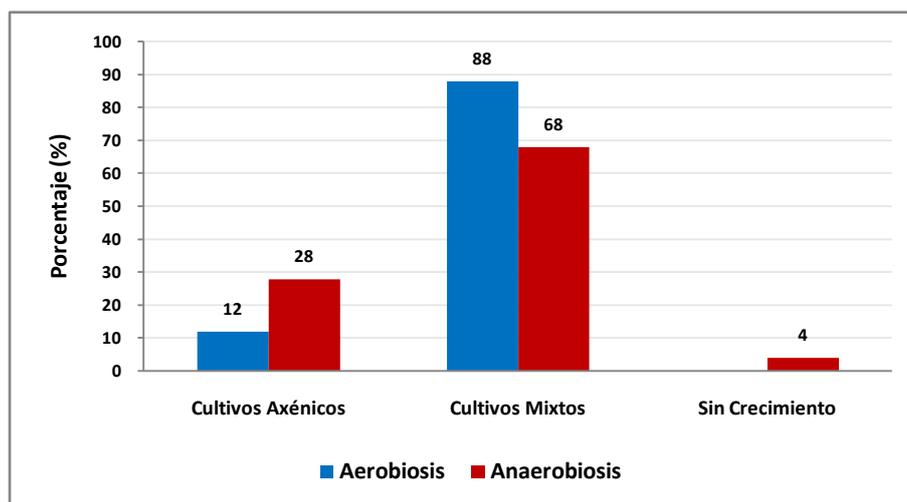


Figura 20. Porcentaje de cultivos axénicos y mixtos obtenidos en condiciones aeróbicas y anaeróbicas en los Núcleos Zoológicos.

3.4. Aislamientos en el Núcleo Zoológico 1

En el Núcleo Zoológico 1 se obtuvieron 11 aislamientos de microorganismos aeróbicos (20,8%), 38 aislamientos de microorganismos anaeróbicos facultativos (71,7%) y 4 aislamientos de microorganismos anaeróbicos estrictos (7,5%) (Figura 21).

Resultados

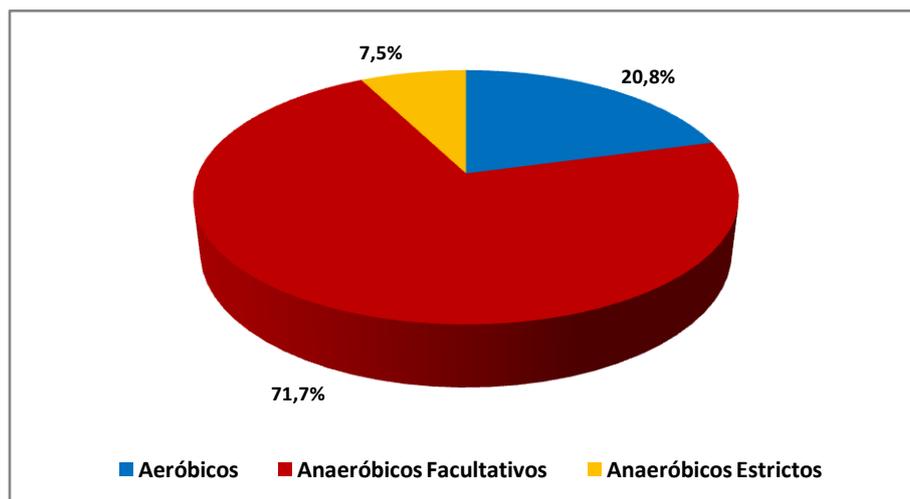


Figura 21. Porcentaje de microorganismos obtenidos en el Núcleo Zoológico 1 según el tipo de respiración.

En el N1 en condiciones aeróbicas, se obtuvo de número promedio 3 especies bacterianas (de 2 a 4 especies diferentes según la muestra) mientras que en condiciones anaeróbicas se obtuvo un número promedio de 2,5 especies bacterianas (de 1 a 5 especies diferentes según la muestra).

En condiciones aeróbicas no se obtuvieron cultivos axénicos. El 100% de los cultivos obtenidos fueron cultivos mixtos (Figura 22). En condiciones aeróbicas no se observaron combinaciones frecuentes de bacterias.

En condiciones anaeróbicas se obtuvo cultivo axénico en una única muestra (10%) y cultivos mixtos en 9 muestras (90%) (Figura 22).

La única bacteria que se obtuvo en cultivo axénico fue una especie del género *Proteus*.

Streptococcus spp. no hemolíticos y especies del género *Proteus*, *Streptococcus* spp. β -hemolíticos y *Lactococcus* spp., y *Streptococcus* spp. no hemolíticos y *Lactococcus* spp. fueron las combinaciones más frecuentes obtenidas en cultivos mixtos en el N1, en 2 muestras cada combinación (22,3% de los cultivos mixtos obtenidos en condiciones anaeróbicas en el N1).

Resultados

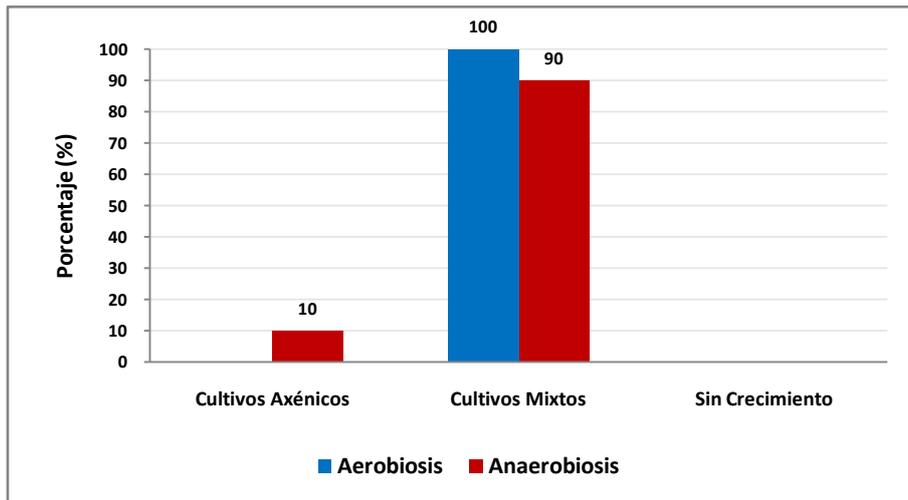


Figura 22. Porcentaje de cultivos axénicos y mixtos obtenidos en condiciones aeróbicas v anaeróbicas en el Núcleo Zoológico 1.

3.5. Aislamientos en el Núcleo Zoológico 2

En el Núcleo Zoológico 2 se obtuvieron 26 aislamientos de microorganismos aeróbicos (28,9%), 63 aislamientos de microorganismos anaeróbicos facultativos (70%) y 1 aislamiento de un microorganismo anaeróbico estricto (1,1%) (Figura 23).

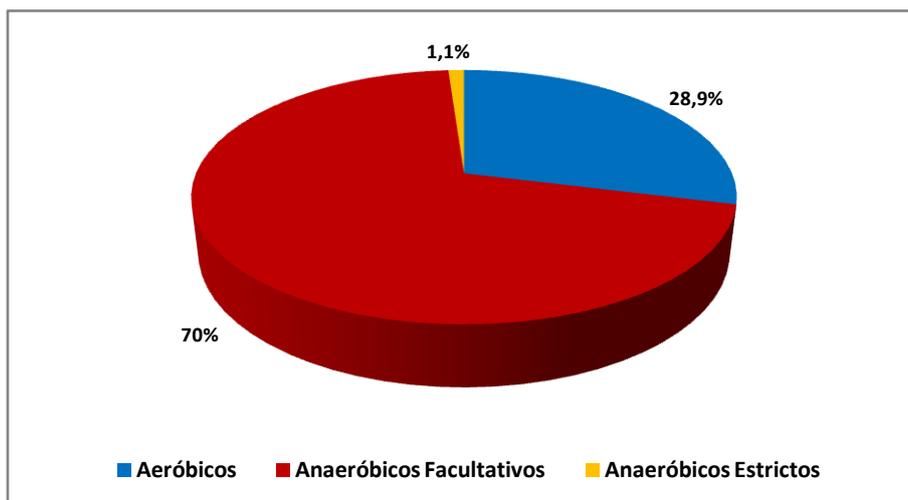


Figura 23. Porcentaje de microorganismos obtenidos en el Núcleo Zoológico 2 según el tipo de respiración.

En el N2 en condiciones aeróbicas, se obtuvo de número promedio 2,7 especies bacterianas (de 1 a 5 especies diferentes según la muestra) mientras que en condiciones anaeróbicas se obtuvo un número promedio de 2,4 especies bacterianas (de 0 a 5 especies diferentes según la muestra).

En condiciones aeróbicas se obtuvieron cultivos axénicos en 6 muestras (26,1%) y cultivos mixtos en 17 muestras (73,9%) (Figura 24).

Escherichia coli fue la bacteria aislada con más frecuencia en cultivo axénico, estando presente en 4 muestras (66.7% de los cultivos aeróbicos axénicos del N2), seguida de especies del género *Bacillus* en 2 muestras (33.3%).

La combinación de bacterias que se aislaron con más frecuencia en cultivo mixto estuvo formada por *Streptococcus* spp. no hemolíticos y *Escherichia coli* en 7 muestras (41,2% de los cultivos mixtos obtenidos en condiciones aeróbicas), seguida de *Staphylococcus pseudintermedius* y *E. coli* en 6 muestras (35,3%), *E. coli* y *Lactococcus* spp. en 5 muestras (29,4%) y *Streptococcus* spp. β -hemolíticos y *E. coli* en 4 muestras (23,5%).

En condiciones anaeróbicas se obtuvieron cultivos axénicos en 7 muestras (30,4%) y cultivos mixtos en 14 muestras (60,9%), mientras que en 2 muestras no se obtuvieron crecimientos (8,7%) (Figura 24).

Escherichia coli también fue la bacteria aislada con mayor frecuencia en cultivo axénico estando presente en 3 muestras (42.9% de los cultivos anaeróbicos axénicos del N2) seguida de especies del género *Lactococcus* spp. 2 muestras (28.6%).

Streptococcus spp. no hemolíticos y *Escherichia coli* también fueron las combinación de bacterias aisladas con más frecuencia en cultivo mixto, en 9 muestras (64,3% de los cultivos mixtos obtenidos en condiciones anaeróbicas), seguidos de *Streptococcus* spp. β -hemolíticos y *E. coli* en 7 muestras (50%), *Lactococcus* spp. y *E. coli* en 7 muestras (50%), *Streptococcus* spp. no hemolíticos y *Streptococcus* spp. β -hemolíticos en 5 muestras (35,7%),

Streptococcus spp. β-hemolíticos y *Lactococcus* spp. en 5 muestras (35,7%) y *Streptococcus* spp. no hemolíticos y *Lactococcus* spp. en otras 5 muestras (35,7%).

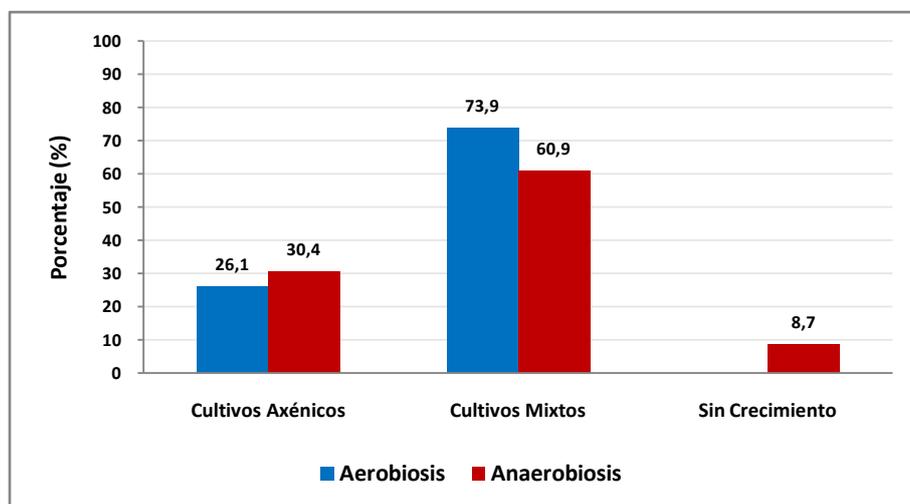


Figura 24. Porcentaje de cultivos axénicos y mixtos obtenidos en condiciones aeróbicas y anaeróbicas en el Núcleo Zoológico 2.

3.6. Aislamientos en el Núcleo Zoológico 3

En el Núcleo Zoológico 3 se obtuvieron 23 aislamientos de microorganismos aeróbicos (30,7%), 52 aislamientos de microorganismos anaeróbicos facultativos (69,3%) y ningún microorganismo anaeróbico estricto (0%) (Figura 25).

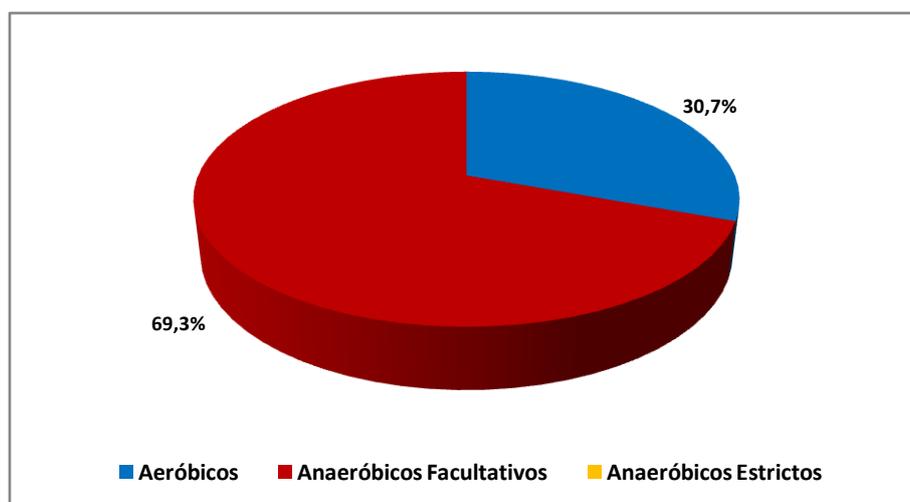


Figura 25. Porcentaje de microorganismos obtenidos en el Núcleo Zoológico 3 según el tipo de respiración.

En el N3 en condiciones aeróbicas, se obtuvo de número promedio 3,7 especies bacterianas (de 2 a 6 especies diferentes según la muestra) mientras que en condiciones anaeróbicas se obtuvo un número promedio de 1,9 especies bacterianas (de 1 a 4 especies diferentes según la muestra).

En relación a los aislamientos obtenidos en el N3, en condiciones aeróbicas tan solo se obtuvieron cultivos mixtos (100%) (Figura 26).

Streptococcus spp. β -hemolíticos y *Escherichia coli* fueron la combinación de bacterias que se aisló con más frecuencia en cultivo mixto, en 10 muestras (58,8% de los cultivos mixtos obtenidos en condiciones aeróbicas en el N3) seguido de *Streptococcus* spp. no hemolíticos y *E. coli* en 5 muestras (29,4%) y *Staphylococcus pseudintermedius* y *E. coli* en 4 muestras (23,5%).

En condiciones anaeróbicas se obtuvieron cultivos axénicos en 6 muestras (35,3%), y cultivos mixtos en 11 muestras (64,7%) (Figura 26).

Especies del género *Streptococcus* no hemolíticos y *Escherichia coli* fueron las bacterias aisladas con más frecuencia en cultivo axénico, estando presentes en 2 muestras cada una (33,4% de los cultivos anaerobios axénicos en el N3), seguidas de una especie del género *Streptococcus* β -hemolítico y del género *Bacillus* en 1 muestra cada una (16,7%).

Streptococcus spp. no hemolíticos y *Streptococcus* spp. β -hemolíticos, y *Lactococcus* spp. y *Streptococcus* spp. β -hemolíticos fueron las combinaciones de bacterias aisladas con más frecuencia en cultivo mixto, en 3 muestras cada combinación (27,3% de los cultivos mixtos obtenidos en condiciones anaeróbicas en el N3), seguidos de *Streptococcus* spp. no hemolíticos y *Escherichia coli*, y *Streptococcus* spp. β -hemolíticos y *E. coli* en 2 muestras cada combinación (18,2%).

Resultados

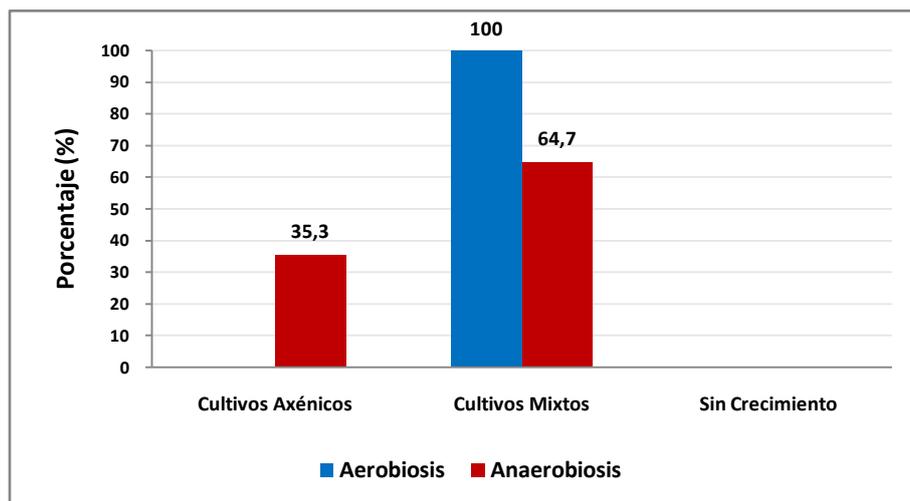


Figura 26. Porcentaje de cultivos axénicos y mixtos obtenidos en condiciones aeróbicas y anaeróbicas en el Núcleo Zoológico 3.

3.7. Aislamientos en las Hembras de los Núcleos Zoológicos

En las hembras de los Núcleos Zoológicos se obtuvieron un total de 114 aislamientos: 18 aislamientos en el N1, 58 aislamientos en el N2 y 38 aislamientos en el N3.

En los aislamientos obtenidos de las muestra vaginales se observó que *Escherichia coli* fue el microorganismo más frecuente con un total de 21 aislamientos (18,4% de los aislamientos totales en las hembras de los Núcleos zoológicos), seguido de *Streptococcus* spp. no hemolíticos con 16 aislamientos (14%), *Streptococcus* spp. β -hemolíticos con 14 aislamientos (12,3%), *Lactococcus* spp. con 12 aislamientos (10,5%) y *Bacillus* spp. con 11 aislamientos (9,65%) (Figura 27).

Resultados

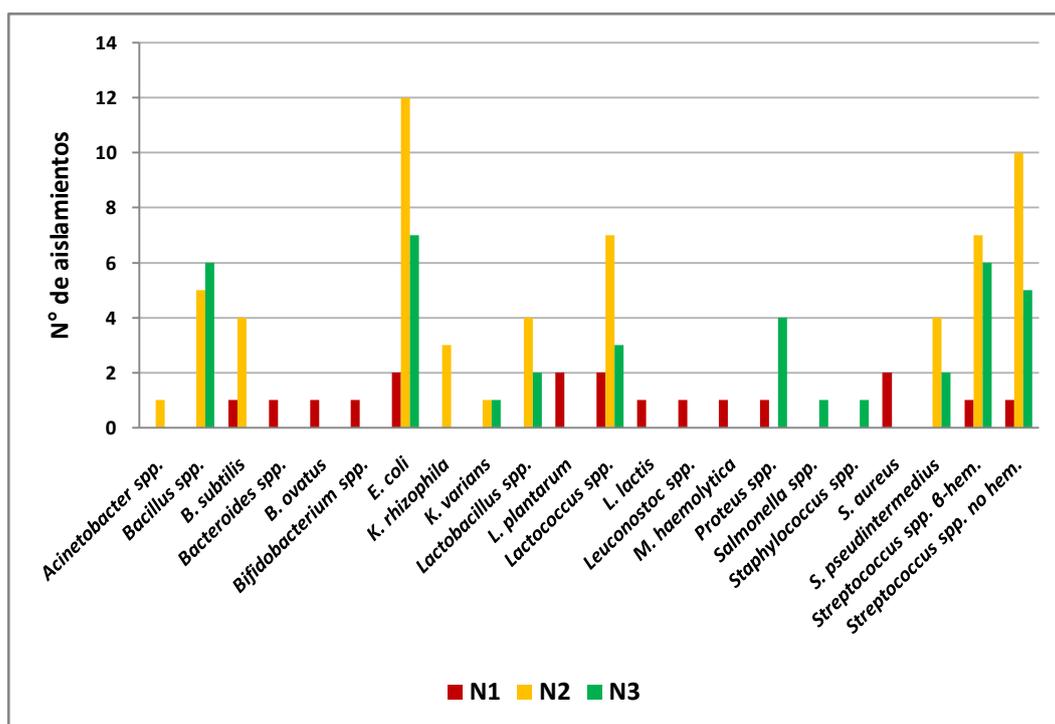


Figura 27. Recuento de los microorganismos totales en las hembras de los Núcleos Zoológicos. (Núcleo Zoológico 1-3: N1-N3).

El estudio estadístico realizado al comparar los porcentajes de aislamientos de cada especie microbiana indicó que, a excepción de tres casos, no existían diferencias significativas entre las especies bacterianas aisladas en las hembras de los Núcleos Zoológicos.

En los porcentajes de aislamientos entre el N1 y los dos Núcleos Zoológicos restantes se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en el aislamiento de *Lactobacillus plantarum* y *Staphylococcus aureus*. El aislamiento tanto de *L. plantarum* y *S. aureus* dentro del N1 correspondieron, cada uno, al 11,1% de los aislamientos totales, mientras que en los otros dos Núcleos Zoológicos no se consiguieron aislar estas especies microbianas (Figura 27).

En cuanto al aislamiento de *Proteus* spp. se observan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el N2 y el N3. El aislamiento de *Proteus* spp. dentro del N3 correspondió a un 10,5% de los aislamientos totales, mientras que en el N2 no se obtuvieron aislamientos (Figura 27).

3.8. Aislamientos en los Machos de los Núcleos Zoológicos

En los machos de los Núcleos Zoológicos se obtuvieron un total de 104 aislamientos: 35 aislamientos en el N1, 32 aislamientos en el N2 y 37 aislamientos en el N3.

En las muestras prepucciales obtenidas se observó que *Escherichia coli* fue el microorganismo aislado con mayor frecuencia con un total de 19 aislamientos (18,3% de los aislamientos totales en los machos de los Núcleos Zoológicos), seguido por *Streptococcus* spp. β -hemolíticos con 14 aislamientos (13,5%), *Streptococcus* spp. no hemolíticos con 13 aislamientos (12,5%), *Lactococcus* spp. con 10 aislamientos (9,6%) y *Staphylococcus pseudintermedius* con 9 aislamientos (8,7%) (Figura 28).

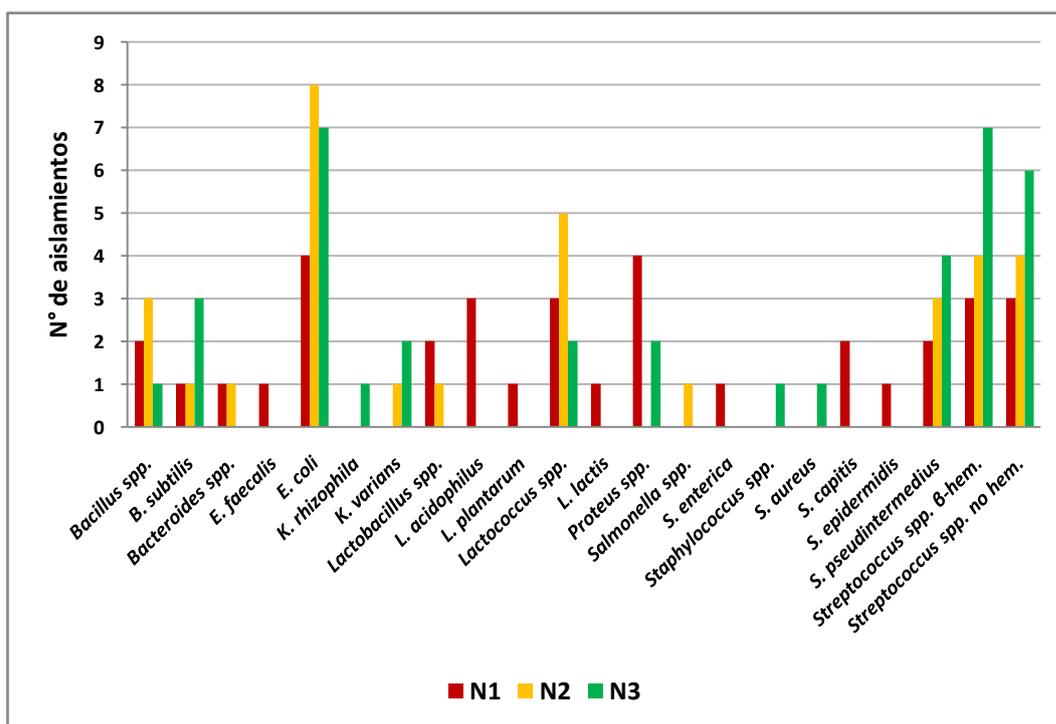


Figura 28. Recuento de los microorganismos totales en los machos de los Núcleos Zoológicos. Núcleo Zoológico 1-3: N1-N3.

El estudio estadístico realizado comparando los porcentajes de aislamientos de cada especie microbiana aislados demostró que, a excepción de un caso, no existían diferencias significativas entre las especies bacterianas aisladas en los machos de los diferentes Núcleos Zoológicos.

En los porcentajes de aislamientos entre el N1 y el N2 se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en el aislamiento de *Proteus* spp. El aislamiento de *Proteus* spp. dentro del N1 correspondió a un 11,4% de los aislamientos totales, mientras que en el N2 no se obtuvieron aislamientos (Figura 28).

3.9. Porcentaje de cultivos axénicos y mixtos obtenidos en machos y hembras de los Núcleos Zoológicos

En las hembras de los Núcleos Zoológicos en condiciones aeróbicas, se obtuvo de número promedio 3,2 especies bacterianas (de 1 a 8 especies diferentes según la muestra) mientras que en condiciones anaeróbicas se obtuvo un número promedio de 2,4 especies bacterianas (de 0 a 5 especies diferentes según la muestra). Referente a los machos de los Núcleos Zoológicos en condiciones aeróbicas, se obtuvo de número promedio 3 especies bacterianas (de 1 a 6 especies diferentes según la muestra) mientras que en condiciones anaeróbicas se obtuvo un número promedio de 2,1 especies bacterianas (de 1 a 5 especies diferentes según la muestra).

A partir de los aislamientos en las hembras de los Núcleos Zoológicos obtenidos en condiciones aeróbicas se consiguieron aislar 3 cultivos axénicos (12%) y 22 cultivos mixtos de hembras (88%). En cuanto a los machos se consiguieron aislar 3 cultivos axénicos (12%) y otros 22 cultivos mixtos (88%) (Figura 29).

Tanto en hembras como en machos dos de los cultivos axénicos se identificaron como *Escherichia coli* (66,7% de los cultivos axénicos) y el restante como una especie del género *Bacillus* (33,4%).

Las combinaciones bacterianas que se aislaron con más frecuencia en los cultivos mixtos de hembras fueron los formados por *Streptococcus* spp. no hemolíticos y *E. coli* en 8 muestras (36,4% de los cultivos mixtos obtenidos en condiciones aeróbicas), seguidos por *Streptococcus* spp. β -hemolíticos y *E. coli* en 6 muestras (27,3%), *Lactococcus* spp. y *E. coli* en 6 muestras (27,3%), *Staphylococcus pseudintermedius* y *E. coli* en 5 muestras (22,7%), *Lactococcus* spp. y *Lactobacillus* spp. en 4 muestras (18,2%) y *Lactobacillus* spp. y *E. coli* en otras 4 muestras (18,2%).

En cuanto a las combinaciones bacterianas que se aislaron en los cultivos mixtos en machos fueron los formados por *Streptococcus* spp. β -hemolíticos y *Escherichia coli* en 8 muestras (36,4% de los cultivos mixtos obtenidos en condiciones aeróbicas), seguidos por *Staphylococcus pseudintermedius* y *E. coli* en 5 muestras (22,7%), *Streptococcus* spp. no hemolíticos y *E. coli* en otras 5 muestras (22,7%) y *Streptococcus* spp. no hemolíticos y *S. pseudintermedius* en 3 muestras (13,6%).

En los aislamientos obtenidos en condiciones anaeróbicas se consiguieron aislar en las muestras de hembras 4 cultivos axénicos (16%), 19 cultivos mixtos (76%) y en dos muestras no se obtuvo crecimiento. En cuanto a las muestras de machos se obtuvieron 10 cultivos axénicos (40%) y 15 cultivos mixtos (60%) (Figura 29).

Los cultivos axénicos obtenidos de las hembras se identificaron como *Escherichia coli* y especies pertenecientes a los géneros *Streptococcus* β -hemolíticos, *Lactococcus* y *Bacillus* cada uno en una muestra (25%).

Referente a los cultivos axénicos obtenidos de machos, se identificó *Escherichia coli* en 4 de las muestras (40%), especies del género *Streptococcus* no hemolíticos en 3 de las muestras (30%), una especie del

Resultados

género *Lactococcus* en 1 muestra (10%) y una especie del género *Streptococcus* β -hemolítico en 1 última muestra (10%).

Las combinaciones bacterianas que se aislaron en condiciones anaeróbicas en los cultivos mixtos de hembras fueron los formados por *Streptococcus* spp. no hemolíticos y *E. coli* en 8 muestras (42,1% de los cultivos mixtos obtenidos en condiciones anaeróbicas), seguidos por *Streptococcus* spp. β -hemolíticos y *E. coli* en 6 muestras (31,6%), *Streptococcus* spp. no hemolíticos y *Streptococcus* spp. β -hemolíticos en 6 muestras (31,6%), *Lactococcus* spp. y *Streptococcus* spp. β -hemolíticos en otras 6 muestras (31,6%) y *Lactococcus* spp. y *Streptococcus* spp. no hemolíticos en 4 muestras (21,1%).

En cuanto a las combinaciones bacterianas que se aislaron en condiciones anaeróbicas en los cultivos mixtos en machos fueron los formados por *Lactococcus* spp. y *Streptococcus* spp. β -hemolíticos en 4 muestras (26,7% de los cultivos mixtos obtenidos en condiciones anaeróbicas), seguidos por *Lactococcus* spp. y *Escherichia coli* en otras 4 muestras (26,7%), *Streptococcus* spp. β -hemolíticos y *E. coli* en 3 muestras (20%), *Streptococcus* spp. no hemolíticos y *E. coli* en 3 muestras (20%), y *Lactococcus* spp. y *Streptococcus* spp. no hemolíticos en otras 3 muestras (20%).

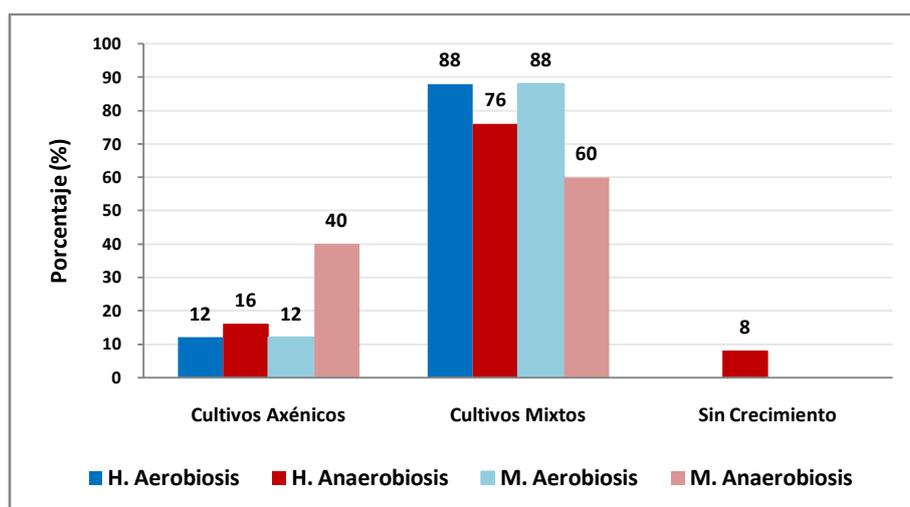


Figura 29. Porcentaje de cultivos axénicos y mixtos obtenidos en condiciones aeróbicas y anaeróbicas en los machos y hembras de los Núcleos Zoológicos.

Ni en las hembras ni en los machos del N1 se consiguieron obtener cultivos axénicos en condiciones aeróbicas. En el 100% de las muestras, tanto en machos como en hembras, los cultivos fueron mixtos (Figura 30).

En hembras no se observaron combinaciones microbianas frecuentes en los cultivos mixtos. En machos, las combinaciones microbianas más frecuentes fueron las formadas por *Streptococcus* spp. no hemolíticos y *Staphylococcus pseudintermedius*, y *Streptococcus* spp. no hemolíticos y *Escherichia coli* en una muestra cada combinación (14,3% de los cultivos mixtos obtenidos en condiciones aeróbicas en machos del N1).

En condiciones anaeróbicas tampoco se obtuvieron cultivos axénicos en hembras. Sin embargo, en machos se obtuvo cultivo axénico en 1 de las muestras (14,3%). Los cultivos mixtos obtenidos en hembras fueron a partir de 3 muestras (100%), mientras que en machos se obtuvieron en 6 de las muestras (85,7%) (Figura 30).

La bacteria aislada en cultivo axénico de la muestra de macho fue una bacteria perteneciente al género *Proteus*.

Las combinaciones microbianas observadas en los cultivos mixtos en hembras estuvieron formadas por *Lactococcus* spp. y *Streptococcus* spp. no hemolíticas, *Lactococcus* spp. y *Streptococcus* spp. β -hemolíticas, y *Streptococcus* spp. y especies del género *Proteus*, en una muestra cada combinación (33,3% de los cultivos mixtos obtenidos en condiciones anaeróbicas en hembras del N1).

En cuanto a las combinaciones microbianas observadas en los cultivos mixtos en machos, estuvieron formadas por *Lactococcus* spp. y *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp. β -hemolíticos y especies del género *Proteus*, *Streptococcus* spp. β -hemolíticos y *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp. no hemolíticos y *Lactococcus* spp., y *Lactobacillus* spp. y *Streptococcus* spp. no hemolíticos, en una muestra cada combinación (16,7% de los cultivos mixtos obtenidos en condiciones anaeróbicas en machos del N1).

Resultados

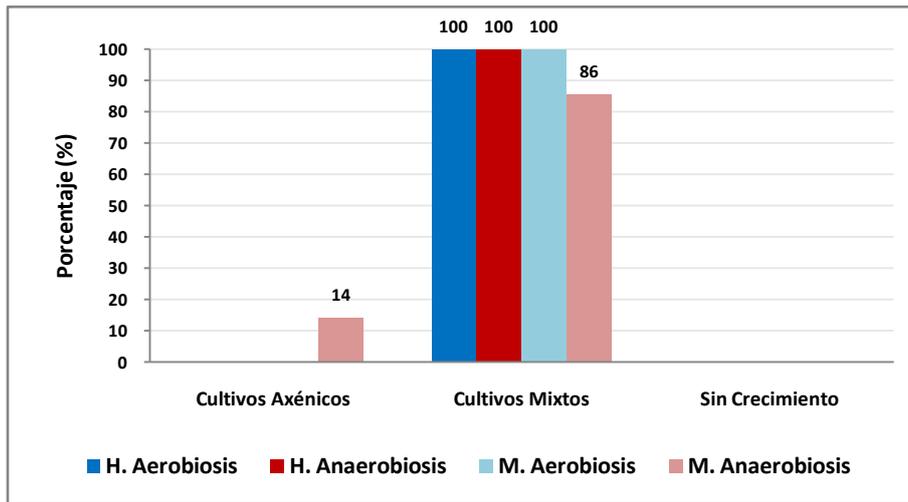


Figura 30. Porcentaje de cultivos axénicos y mixtos obtenidos en condiciones aeróbicas y anaeróbicas en los machos y hembras del Núcleo Zoológico 1.

Tanto en las hembras como en los machos del N2 se obtuvieron 3 cultivos axénicos en condiciones aeróbicas (21,4% del total de aislamientos en hembras del N2 y 33,3% del total de aislamientos en machos del N2). En hembras se obtuvieron cultivos mixtos en 11 muestras (78,6%) y en machos en 6 de las muestras (66,7%) (Figura 31).

En ambos géneros *Escherichia coli* fue la bacteria que se aisló con más frecuencia en cultivo axénico, concretamente en 2 muestras tanto en hembras como en machos (66.7% respectivamente), seguida de una especie del género *Bacillus* que se aisló en 1 muestra tanto en hembras como en machos (33.3% respectivamente).

La combinación de bacterias más frecuente aislada en cultivo mixto en hembras del N2 estuvo formada por *Streptococcus* spp. no hemolíticos y *Escherichia coli* en 5 muestras (45,5% de los cultivos mixtos obtenidos en condiciones aeróbicas en hembras del N2), seguida por *Lactococcus* spp. y *E. coli* en 4 muestras (36,4%), y *Staphylococcus pseudintermedius* y *E. coli* en 3 muestras (27,3%).

En cuanto a las combinación de bacterias más frecuente aisladas en cultivo mixto en machos estuvo formada por *S. pseudintermedius* y *E. coli* en 3 muestras (50% de los cultivos mixtos obtenidos en condiciones aeróbicas en machos del N2), seguido por *Streptococcus* spp. no hemolíticos y *E. coli* en 2 muestras (33,3%).

En condiciones anaeróbicas se obtuvieron cultivos axénicos en 2 muestras de hembras (14,3%), mientras que en machos se obtuvieron cultivos axénicos en 5 muestras (55,6%). En hembras se obtuvieron cultivos mixtos en 10 muestras (71,4%) y en machos en 4 de las muestras (44,4%). En las hembras no se obtuvo crecimiento bacteriano en 2 de las muestras (14,3%) (Figura 31).

Los cultivos axénicos obtenidos en las hembras se identificaron como una especie del género *Streptococcus* β -hemolíticos y del género *Lactococcus*. En machos, *E. coli* fue la bacteria aislada en cultivo axénico con mayor frecuencia, estando presente en 3 muestras (60%), seguida de una especie del género *Streptococcus* no hemolítico y del género *Lactococcus* en 1 muestra cada una (20%).

La combinación de bacterias aisladas con más frecuencia en cultivo mixto en hembras fue la formada por *Streptococcus* spp. no hemolíticos y *E. coli* en 7 muestras (70% de los cultivos mixtos obtenidos en condiciones anaeróbicas en hembras del N2), seguidos por *Streptococcus* spp. β -hemolíticos y *E. coli* en 5 muestras (50%) y *Streptococcus* spp. no hemolíticos y *Streptococcus* spp. β -hemolíticos en 4 muestras (40%).

En cuanto a la combinación de bacterias aisladas con más frecuencia en cultivo mixto en machos fue la formada por *Lactococcus* spp. y *E. coli* en 4 muestras (100% de los cultivos mixtos obtenidos en condiciones anaeróbicas en machos del N2), seguida de *Streptococcus* spp. β -hemolíticos y *E. coli*, *Streptococcus* spp. no hemolíticos, *E. coli*, *Lactococcus* spp. y *Streptococcus* spp. β -hemolíticos, y *Streptococcus* β -hemolíticos y *Lactococcus* spp. todas las combinaciones aisladas en 2 muestras (50%).

Resultados

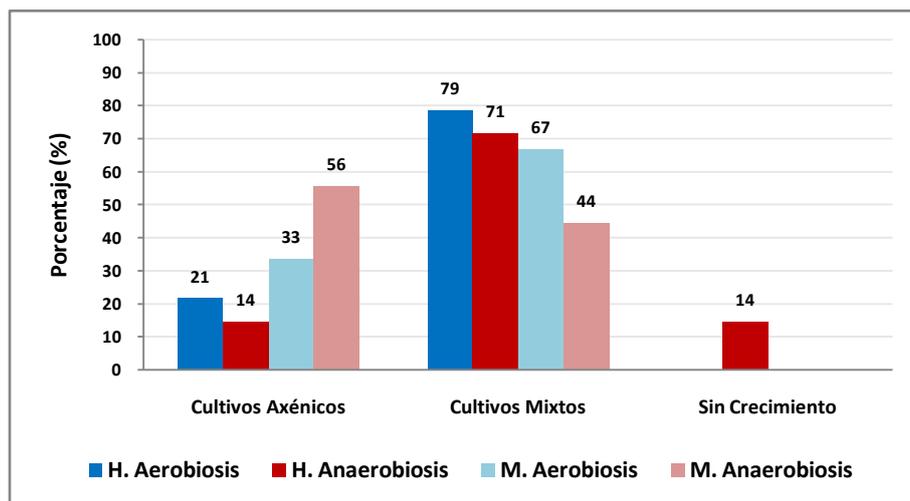


Figura 31. Porcentaje de cultivos axénicos y mixtos obtenidos en condiciones aeróbicas y anaeróbicas en los machos y hembras del Núcleo Zoológico 2.

Ni en las hembras ni en los machos del N3 se obtuvieron cultivos axénicos en condiciones aeróbicas, tan solo cultivos mixtos (100% en ambos géneros) (Figura 32).

La combinación de bacterias más frecuente aisladas en cultivo mixto en hembras fue la formada por *Streptococcus* spp. β -hemolíticos y *Escherichia coli* en 4 muestras (50% de los cultivos mixtos obtenidos en condiciones aeróbicas en hembras del N3) seguidas por *Streptococcus* spp. no hemolíticos y *E. coli* en 3 muestras (37,5%), y *Streptococcus* spp. β -hemolíticos y *Staphylococcus pseudintermedius*, *E. coli* y *S. pseudintermedius*, *Lactococcus* spp. y *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp. y *Streptococcus* spp. β -hemolíticos, *Lactococcus* spp. y *Streptococcus* spp. no hemolíticos, y *Lactobacillus* spp. y *E. coli*, en 2 muestras cada combinación (25%).

En cuanto a la combinación de bacterias más frecuente aisladas en cultivo mixto en machos fue la formada por *Streptococcus* spp. β -hemolíticos y *E. coli* en 6 muestras (66,7% de los cultivos mixtos obtenidos en condiciones aeróbicas en machos del N3), seguidos por *S. pseudintermedius* y *E. coli*, *Streptococcus* spp. no hemolíticos y *S. pseudintermedius*, *Streptococcus* spp. no hemolíticos y *E. coli*, *Streptococcus* spp. β -hemolíticos y *Streptococcus* spp. no hemolíticos, y *Streptococcus* spp. y especies del género *Proteus*, en 2 muestras cada combinación (22,2%).

Resultados

En condiciones anaeróbicas se obtuvieron cultivos axénicos en 2 muestras de hembras (25%) y en otras 4 muestras de machos (44,4%). En hembras se obtuvieron cultivos mixtos en 6 muestras (75%) y en machos en 5 muestras (55,6%) (Figura 32).

En hembras se aislaron en cultivo axénico una especie del género *Bacillus* en 1 muestra (50% de los cultivos axénicos obtenidos en condiciones anaeróbicas en hembras del N3) y *Escherichia coli* en la otra (50%).

En el caso de los machos se aislaron con más frecuencia especies del género *Streptococcus* β -hemolítico en 2 muestras (50% de los cultivos axénicos en condiciones anaeróbicas en machos del N3), seguidas por *E. coli* en 1 muestra (25%) y una especie del género *Streptococcus* no hemolítico en 1 muestra (25%).

La combinación de bacterias aisladas con más frecuencia en cultivo mixto en hembras fueron las formadas por *Streptococcus* spp. no hemolíticos y *Streptococcus* spp. β -hemolíticos, y *Lactococcus* spp. y *Streptococcus* spp. β -hemolíticos en 2 muestras cada combinación (33,3% de los cultivos mixtos obtenidos en condiciones anaeróbicas en hembras del N3).

Resultados

En cuanto a la combinación de bacterias aisladas con más frecuencia en cultivo mixto en machos fueron las formadas por *Streptococcus* spp. β -hemolíticos y *E. coli*, *Streptococcus* spp. no hemolíticos y *E. coli*, *Streptococcus* spp. no hemolíticos y *Streptococcus* spp. β -hemolíticos y *Lactococcus* spp. y *Streptococcus* spp. β -hemolíticos en 1 muestra cada combinación (20% de los cultivos mixtos obtenidos en condiciones anaeróbicas en machos del N3).

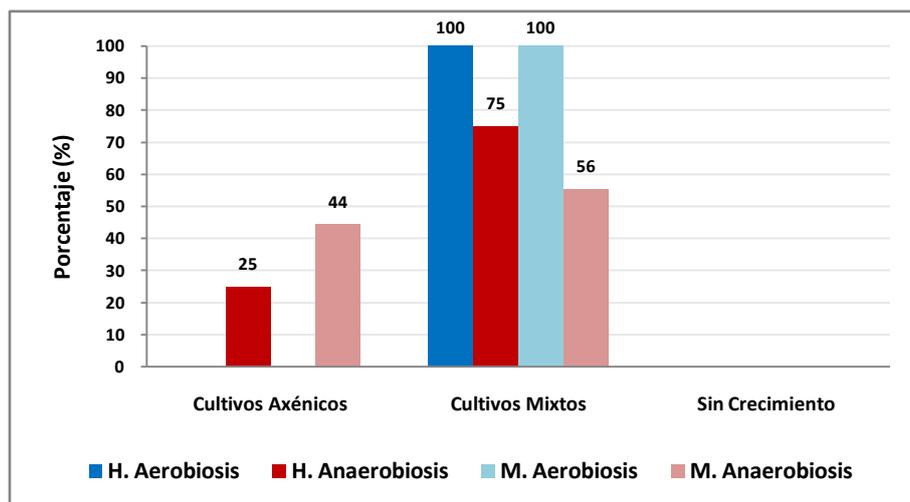


Figura 32. Porcentaje de cultivos axénicos y mixtos obtenidos en condiciones aeróbicas y anaeróbicas en los machos y hembras del Núcleo Zoológico 3.

4. Estudio descriptivo de la microbiota genital en pacientes de la FHCV

4.1. Resultados de los recuentos microbianos

En el grupo de hembras con signos clínicos (CSCR) se obtuvieron un total de 103 aislamientos, en el grupo de HC se obtuvieron un total de 248 aislamientos, en el grupo de hembras para OCR se obtuvieron 47 aislamientos y, por último, en el grupo de MCHV se obtuvieron un total de 24 aislamientos.

En los aislamientos obtenidos el sumatorio de los grupos del Hospital Clínico Veterinario se observó que *Staphylococcus pseudintermedius* fue el microorganismo más frecuente con 71 aislamientos (16,8% de los aislamientos totales en los núcleos zoológicos), seguido de *Lactococcus* spp. con 54 aislamientos (12,8%), *Streptococcus* spp. β-hemolíticos con 44 aislamientos (10,4%), *Lactobacillus* spp. con 40 aislamientos (9,5%), *Bacillus* spp. con 35 aislamientos (8,3%), *Escherichia coli* con 33 aislamientos (7,8%) y *Streptococcus* spp. no hemolíticos con 29 aislamientos (6,9%). (Figura 33).

Los microorganismos obtenidos en los cuatro grupos se encuentran ya detallados en el apartado 2.1. *Resultados de los recuentos microbianos*, del apartado 2. *Aislamientos bacterianos de los animales estudiados* (pág. 87).

El estudio estadístico realizado al comparar los porcentajes de aislamientos de cada especie microbiana obtenidos en los grupos del Hospital Clínico Veterinario indicó que, a excepción de 5 casos, no existían diferencias entre las especies bacterianas aisladas.

En los porcentajes de aislamientos entre las hembras OCR y los MCHV se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en el aislamiento de *Bacteroides* spp. El aislamiento de *Bacteroides* spp. dentro del grupo de MCHV correspondió a un 8,3% de los aislamientos totales, mientras que en el grupo de hembras para OCR no se obtuvieron aislamientos (Figura 34).

En cuanto a los porcentajes de aislamientos entre los MHCV y las hembras CSCR y HC se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en el aislamiento de *Enterococcus* spp. El aislamiento de *Enterococcus* spp. dentro del grupo de MHCV correspondió al 4,2% de los aislamientos totales, mientras que para el grupo de hembras CSCR y HC correspondió el 0% y el 0,4% de los aislamientos totales, respectivamente (Figura 34).

Otro caso en el que se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$), esta vez entre el grupo de MHCV y los grupos de hembras, fue en el aislamiento de *Kocuria* spp. El aislamiento de *Kocuria* spp. dentro del grupo de MHCV correspondió al 8,3% de los aislamientos totales, mientras que para las hembras CSCR, HC y hembras para OCR correspondió el 1%, 0% y 0% de los aislamientos totales, respectivamente (Figura 34).

En los porcentajes de aislamientos entre las hembras CSCR y las hembras OCR se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en el aislamiento de *Lactobacillus* spp. El aislamiento de *Lactobacillus* spp. dentro del grupo de hembras OCR correspondió al 17% de los aislamientos, mientras que para las hembras CSCR correspondió al 5,8% de los aislamientos totales (Figura 34).

Por último, en el caso de los porcentajes de aislamientos de *Proteus* spp. se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las hembras CSCR y HC, y HC con los MHCV. El aislamiento de *Proteus* dentro del grupo de hembra CSCR correspondió al 1,9% de los aislamientos mientras que para las HC no se obtuvieron aislamientos. Del mismo modo, dentro del grupo de MHCV se obtuvo un 4,2% de aislamientos totales respecto al 0% obtenido en las HC (Figura 34).

Resultados

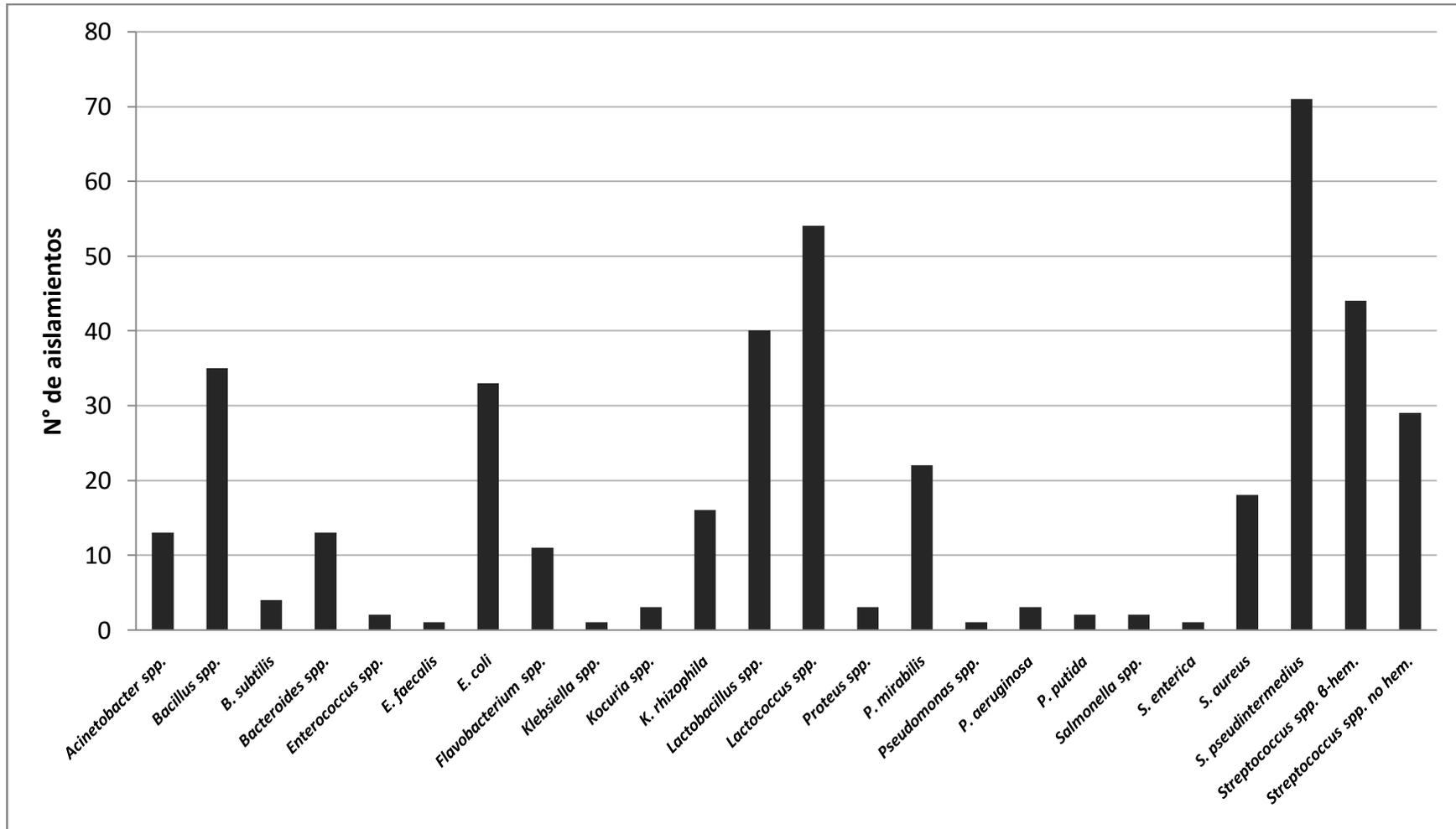


Figura 33. Recuento de los microorganismos en los grupos de estudio de la FHCV.

Resultados

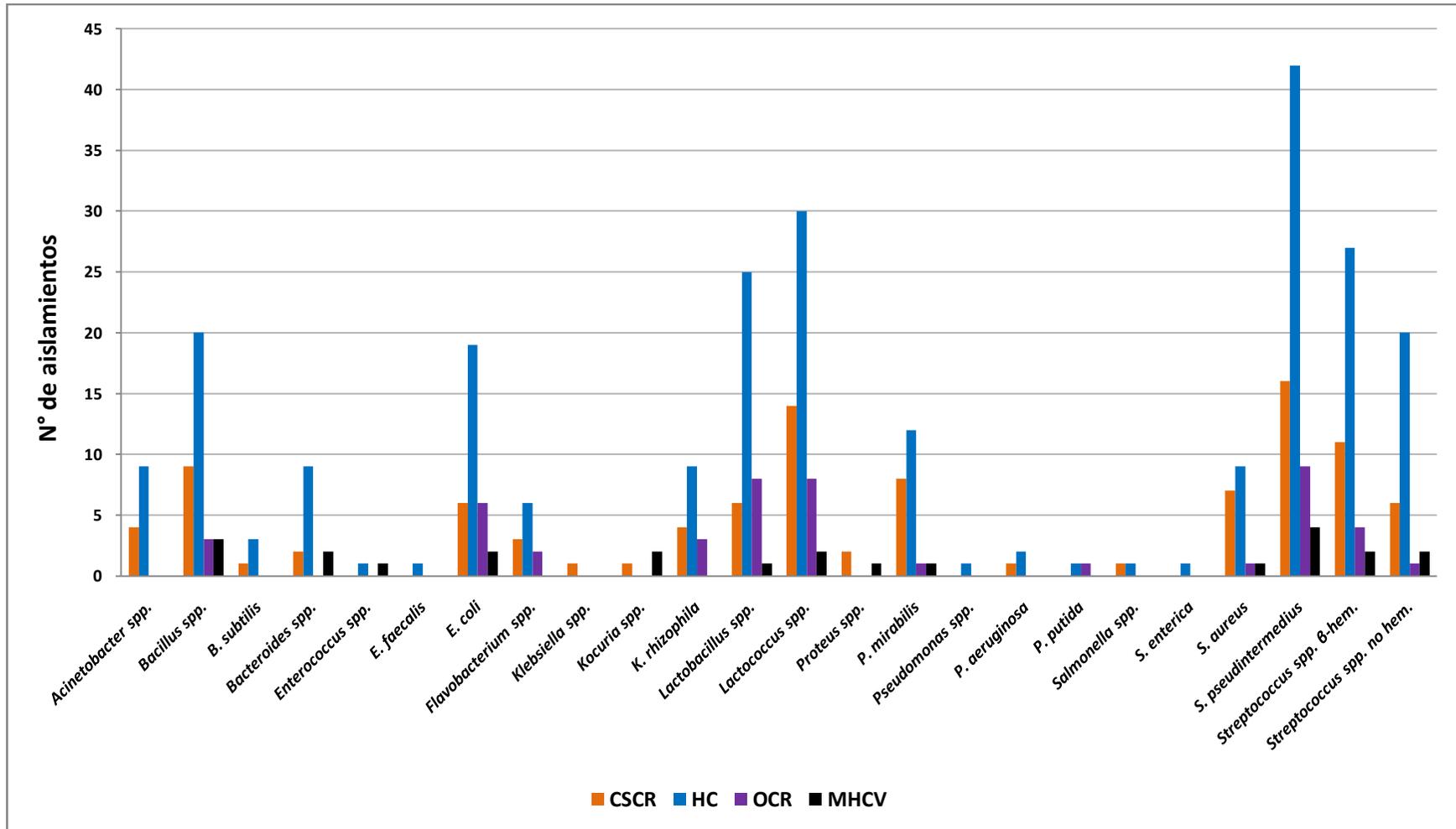


Figura 34. Recuento de los microorganismos en los grupos de estudio de la FHCV. CSCR: Con Signos Clínicos Reproductivos; HC: Hembras en celo; OCR: Otros Controles Reproductivos; MHCV: Machos del Hospital Clínico Veterinario.

4.2. Porcentaje de microorganismos según el tipo de respiración

En los 4 grupos procedentes del Hospital Clínico Veterinario se obtuvieron 171 aislamientos de microorganismos aeróbicos (40,5%), 238 de microorganismos anaeróbicos facultativos (56,4%) y 13 de microorganismos anaeróbicos estrictos (3,1%) (Figura 35).

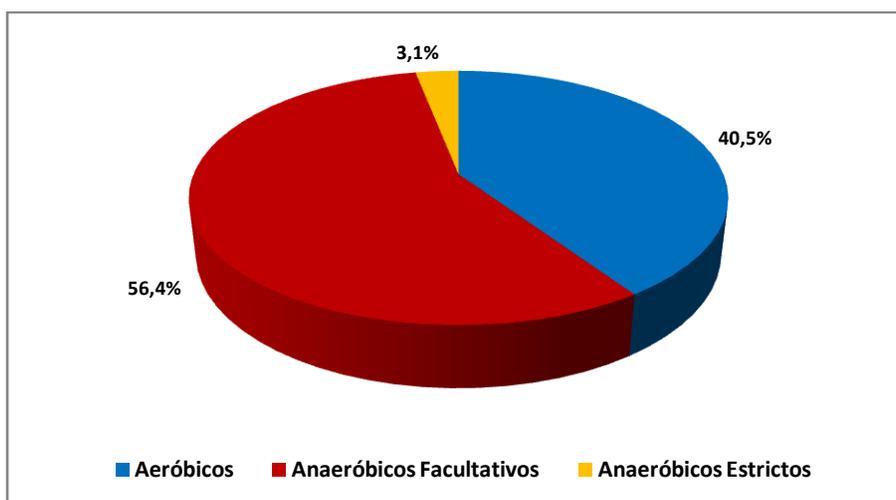


Figura 35. Porcentaje de microorganismos obtenidos en los grupos del Hospital Clínico Veterinario según el tipo de respiración.

El estudio estadístico realizado para comparar los porcentajes obtenidos de cada tipo de respiración dentro de un mismo grupo del Hospital Clínico Veterinario indicó que no existían diferencias significativas en ningún caso.

4.3. Porcentaje de cultivos axénicos y mixtos

En los grupos del Hospital Clínico Veterinario en condiciones aeróbicas, se obtuvo de número promedio 4,1 especies bacterianas (de 1 a 8 especies diferentes según la muestra) mientras que en condiciones anaeróbicas se obtuvo un número promedio de 2,9 especies bacterianas (de 0 a 7 especies diferentes según la muestra).

En condiciones aeróbicas se obtuvieron cultivos axénicos en 2 muestras (2,4%) y cultivos mixtos en 83 muestras (97,6%) (Figura 36). *Escherichia coli* fue el microorganismo aislado en cultivo axénico en ambas muestras.

En cuanto a las combinaciones microbianas aisladas con más frecuencia en cultivo mixto fueron las formadas por *Lactococcus* spp. y *Staphylococcus pseudintermedius* en 30 muestras (36,1% de los cultivos mixtos en condiciones aeróbicas), seguidas de *S. pseudintermedius* y *Escherichia coli* en 27 muestras (32,5%), *Streptococcus* spp. β -hemolíticos y *S. pseudintermedius* en 26 muestras (31,3%), *Lactobacillus* spp. y *S. pseudintermedius* en 25 muestras (30,1%), *Streptococcus* spp. no hemolíticos y *S. pseudintermedius* en 21 muestras (25,3%), *Lactococcus* spp. y *Escherichia coli* en 20 muestras (24,1%), *S. pseudintermedius* y especies del género *Proteus* en 19 muestras (22,9%) y *Lactococcus* spp. y *Lactobacillus* spp. en 17 muestras (20,5%).

Las muestras en las que se aislaron cultivos axénicos en condiciones anaeróbicas fueron 8 (9,4%), los cultivos mixtos se obtuvieron en 72 muestras (84,7%) y en las 5 muestras restantes no se obtuvieron crecimientos (5,9%) (Figura 36).

Se identificaron especies del género *Lactococcus* en dos cultivos axénicos (25%), otras especies del género *Streptococcus* no hemolíticos en dos cultivos axénicos (25%), especies del género *Streptococcus* β -hemolíticos en otros dos cultivos

Resultados

axénicos (25%), *Escherichia coli* se identificó en cultivo axénico en otra muestra (12,5) y una especie del género *Bacteroides* en una última muestra (12,5%).

En cuanto a las combinaciones bacterianas aisladas con más frecuencia en cultivo mixto fueron las formadas por *Lactococcus* spp. y *Streptococcus* spp. β -hemolíticos en 27 muestras (37,5% de los cultivos mixtos obtenidos en condiciones anaeróbicas), seguidos por *Lactococcus* spp. y *Lactobacillus* spp. en 25 muestras (34,7%), *Lactococcus* spp. y *E. coli* en 23 muestras (31,9%), *Lactococcus* spp. y *Staphylococcus pseudintermedius* en 21 muestras (29,2%) y *Lactobacillus* spp. y *Streptococcus* spp. β -hemolíticos en 19 muestras (26,4%).

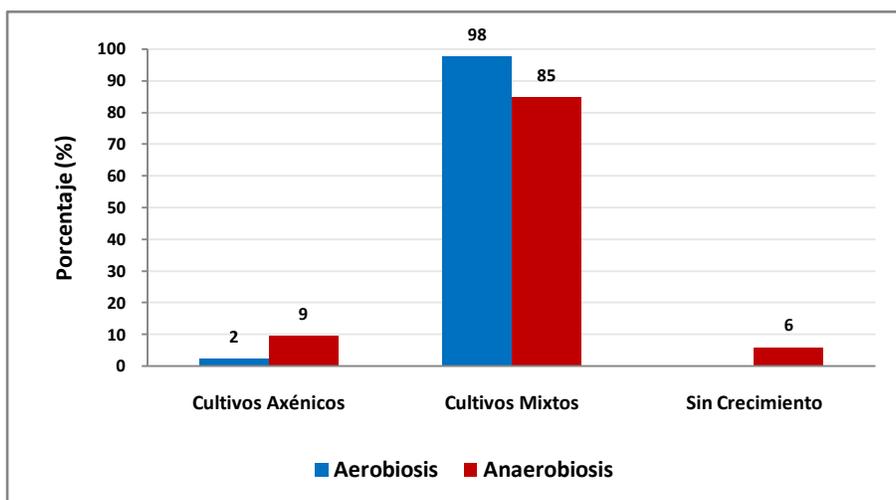


Figura 36. Porcentaje de cultivos axénicos y mixtos obtenidos en condiciones aeróbicas y anaeróbicas en los grupos procedentes de la FH CV.

4.4. Aislamientos en las perras Con Signos Clínicos Reproductivos (CSCR)

En este grupo de hembras se obtuvo un total de 45 aislamientos de microorganismos aeróbicos (43,7%), 56 aislamientos de microorganismos anaeróbicos facultativos (54,4%) y 2 aislamientos de microorganismos anaeróbicos estrictos (1,9%) (Figura 37).

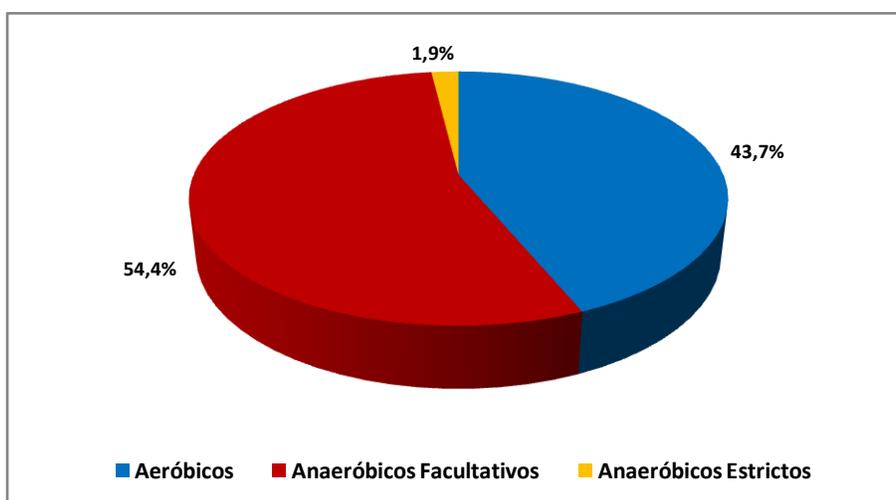


Figura 37. Porcentaje de microorganismos obtenidos en los grupos de hembras Con Signos Clínicos Reproductivos según el tipo de respiración.

El estudio estadístico realizado para comparar los porcentajes obtenidos de cada tipo de respiración entre los grupos de hembras CSCR no determinó diferencias significativas en ningún caso.

En el grupo de hembras CSCR en condiciones aeróbicas, se obtuvo de número promedio 3,8 especies bacterianas (de 1 a 8 especies diferentes según la muestra) mientras que en condiciones anaeróbicas se obtuvo un número promedio de 2,4 especies bacterianas (de 0 a 6 especies diferentes según la muestra).

Resultados

En condiciones aeróbicas se obtuvieron cultivos axénicos en 2 muestras (8,7%) y cultivos mixtos en 21 muestras (91,3%) (Figura 38). *Escherichia coli* fue la bacteria que se aisló en cultivo axénico en ambas muestras.

La combinación de bacterias aisladas con más frecuencia en cultivo mixto fue la formada por *Streptococcus* spp. β -hemolíticos y *Staphylococcus pseudintermedius* en 7 muestras (33,3% de los cultivos mixtos en condiciones aeróbicas del grupo CSCR), seguidas por *S. pseudintermedius* y especies del género *Proteus* en 6 muestras (28,6%), y *Lactococcus* spp. y *S. pseudintermedius* en otras 6 muestras (28,6%).

En condiciones anaeróbicas se obtuvieron cultivos axénicos en 4 muestras (17,4%) y mixtos en 18 (78,3%). En la muestra restante no se obtuvo crecimiento (4,3%) (Figura 38).

Especies del género *Lactococcus* fueron las bacterias que se aislaron con más frecuencia en cultivo axénico, concretamente en 2 muestras (50%), seguidas de *Escherichia coli* y una especie del género *Streptococcus* β -hemolítico en 1 muestra, respectivamente (25%).

La combinación de bacterias aisladas con más frecuencia en cultivo mixto fue la formada por *Lactococcus* spp. y *Streptococcus* spp. β -hemolíticos en 5 muestras (27,8% de los cultivos mixtos en condiciones anaeróbicas en el grupo CSCR), seguidos por *Lactococcus* spp. y *Staphylococcus pseudintermedius* en otras 5 muestras (27,8%), *Streptococcus* spp. β -hemolíticos y especies del género *Proteus* en 4 muestras (22,2%) y *Streptococcus* spp. β -hemolíticos y *S. pseudintermedius* en otras 4 muestras (22,2%).

Resultados

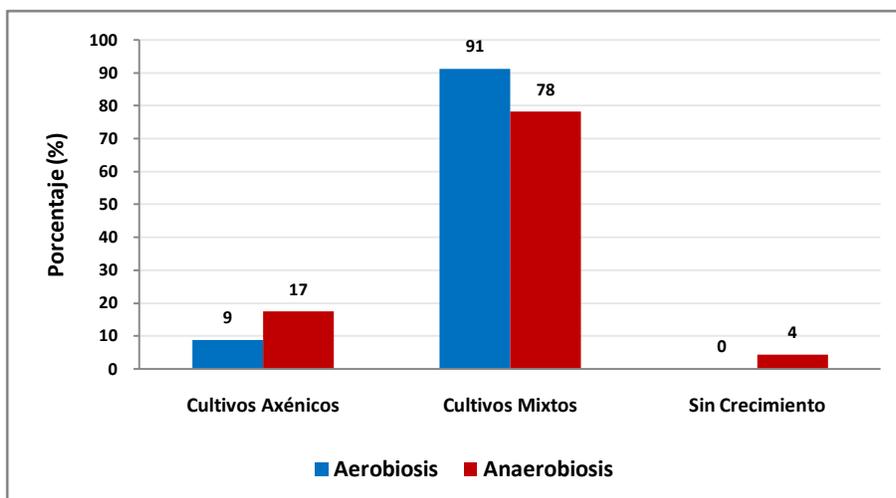


Figura 38. Porcentaje de cultivos axénicos y mixtos obtenidos en condiciones aeróbicas y anaeróbicas en el grupo de hembras Con Signos Clínicos Reproductivos.

4.5. Aislamientos en las Hembras en Celo (HC)

En el grupo HC se obtuvo un total de 98 aislamientos de microorganismos aeróbicos (39,5%), 141 aislamientos de microorganismos anaeróbicos facultativos (56,9%) y 9 aislamientos de microorganismos anaeróbicos estrictos (3,6%) (Figura 39).

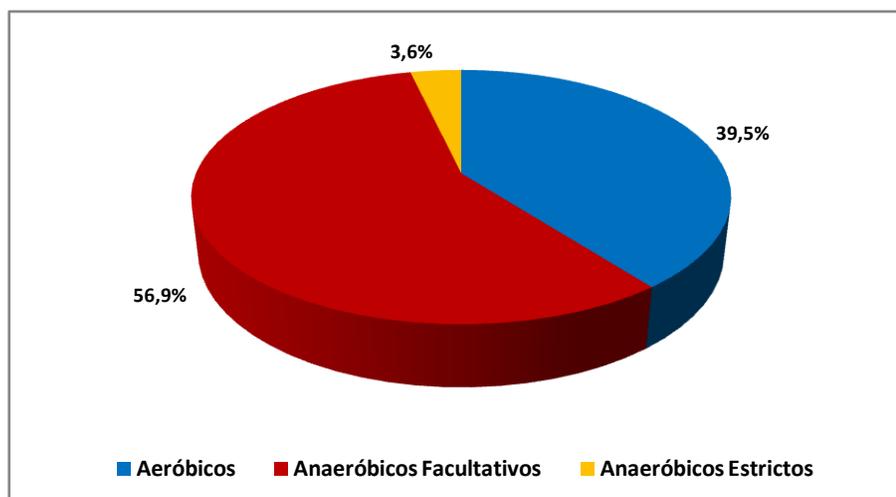


Figura 39. Porcentaje de microorganismos obtenidos en los grupos de Hembras en Celo según el tipo de respiración.

Resultados

En el grupo de HC en condiciones aeróbicas, se obtuvo de número promedio 4,3 especies bacterianas (de 2 a 7 especies diferentes según la muestra) mientras que en condiciones anaeróbicas se obtuvo un número promedio de 3,1 especies bacterianas (de 0 a 7 especies diferentes según la muestra).

En condiciones aeróbicas no se obtuvieron cultivos axénicos, todos fueron cultivos mixtos (Figura 40).

Las combinaciones bacterianas aisladas con más frecuencia en cultivo mixto fue la formada por *Lactobacillus* spp. y *Staphylococcus pseudintermedius* en 18 muestras (37,5% de los cultivos mixtos obtenidos en condiciones aeróbicas en el grupo HC), seguidas por *Lactococcus* spp. y *S. pseudintermedius* en 17 muestras (35,4%), *S. pseudintermedius* y *Escherichia coli* en 16 muestras (33,3%), *Streptococcus* spp. β -hemolíticos y *S. pseudintermedius* en 15 muestras (31,3%) y *Streptococcus* spp. no hemolíticos y *S. pseudintermedius* en otras 15 muestras (31,3%).

En condiciones anaeróbicas se obtuvieron cultivos axénicos en 2 muestras (4,2%), cultivos mixtos en 42 muestras (87,5%) y en las 4 muestras restantes no se obtuvieron crecimientos bacterianos (8,3%) (Figura 40).

Los microorganismos que se aislaron en cultivo axénico en ambas muestras fueron especies del género *Streptococcus* no hemolíticos.

La combinación de bacterias aisladas con más frecuencia fue la formada por *Lactococcus* spp. y *Streptococcus* spp. β -hemolíticos en 18 muestras (42,9% de los cultivos mixtos obtenidos en condiciones anaeróbicas en el grupo de HC), seguidas de *Lactococcus* spp. y *Escherichia coli* en 16 muestras (38,1%), *Lactobacillus* spp. y *Streptococcus* spp. β -hemolíticos en 15 muestras (35,7%) y *Lactococcus* spp. y *Lactobacillus* spp. en 14 muestras (33,3%).

Resultados

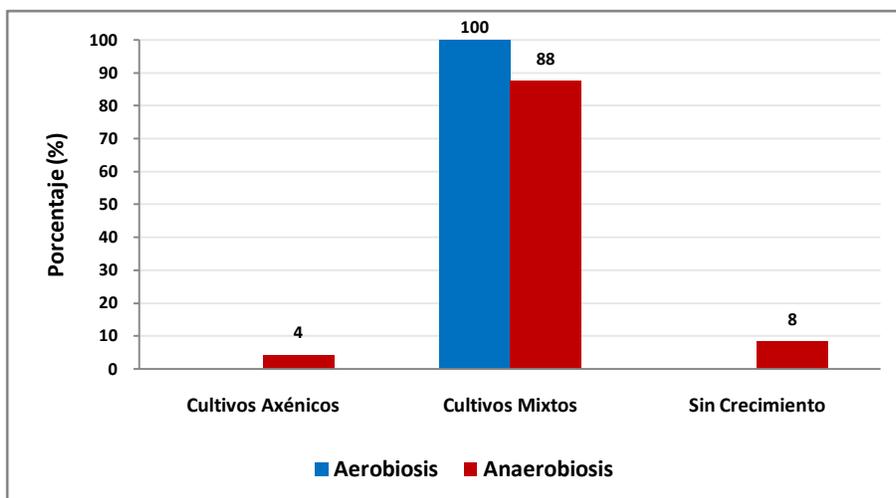


Figura 40. Porcentaje de cultivos axénicos y mixtos obtenidos en condiciones aeróbicas y anaeróbicas en el grupo de Hembras en Celo.

4.6. Aislamientos en las perras de Otros Controles Reproductivos (OCR)

En el grupo de hembras OCR se obtuvo un total de 18 aislamientos de bacterias aeróbicas (38,3%), 29 aislamientos de bacterias anaeróbicas facultativas (61,7%) y no se obtuvo ningún crecimiento de bacterias anaeróbicas estrictas (Figura 41).

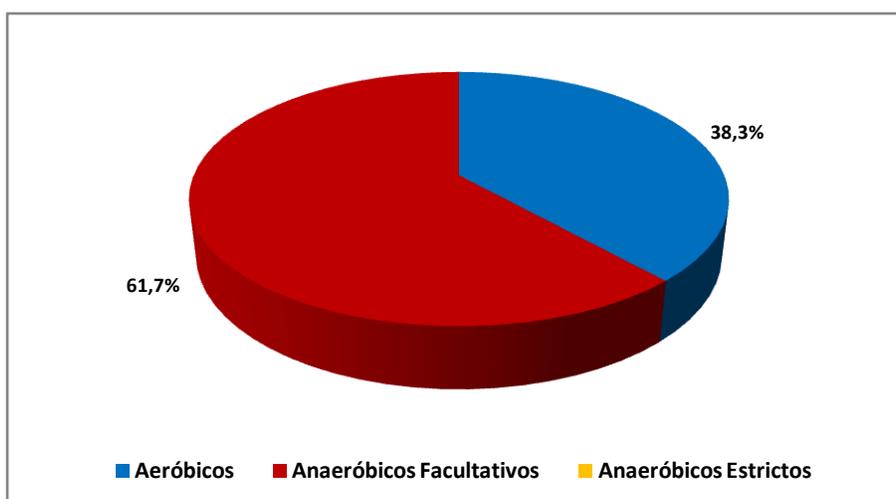


Figura 41. Porcentaje de microorganismos obtenidos en los grupos de hembras para Otros Controles Reproductivos según el tipo de respiración.

Resultados

En el grupo de hembras para OCR en condiciones aeróbicas, se obtuvo de número promedio 4,4 especies bacterianas (de 3 a 6 especies diferentes según la muestra) mientras que en condiciones anaeróbicas se obtuvo un número promedio de 3,4 especies bacterianas (de 1 a 5 especies diferentes según la muestra).

En condiciones aeróbicas no se obtuvieron crecimientos axénicos, tan solo crecimientos de cultivo mixto en la totalidad de las muestras (Figura 42).

La combinación de bacterias que se aislaron con más frecuencia fue la formada por *Lactococcus* spp. y *Staphylococcus pseudintermedius* en 7 muestras (77,8% de los cultivos mixtos obtenidos en condiciones aeróbicas en el grupo OCR), seguidas de *S. pseudintermedius* y *Escherichia coli* en 6 muestras (66,7%), *Lactococcus* spp. y *E. coli* en 5 muestras (55,6%) y *Lactobacillus* spp. y *S. pseudintermedius* en 4 muestras (44,4%).

En condiciones anaeróbicas se obtuvo cultivo axénico en 1 de las muestras (11%) y cultivo mixto en 8 muestras (89%) (Figura 42). Se aisló en cultivo axénico una especie del género *Streptococcus* β -hemolítico.

La combinación de bacterias que se aislaron con más frecuencia fue la formada por *Lactococcus* spp. y *Lactobacillus* spp. en 7 muestras (87,5% de los cultivos mixtos obtenidos en condiciones anaeróbicas en el grupo OCR) seguidas por *Lactococcus* spp. y *Escherichia coli* en 5 muestras (62,5%), *Lactococcus* spp. y *Staphylococcus pseudintermedius* en 4 muestras (50%) y *Lactobacillus* spp. y *E. coli* en otras 4 muestras (50%).

Resultados

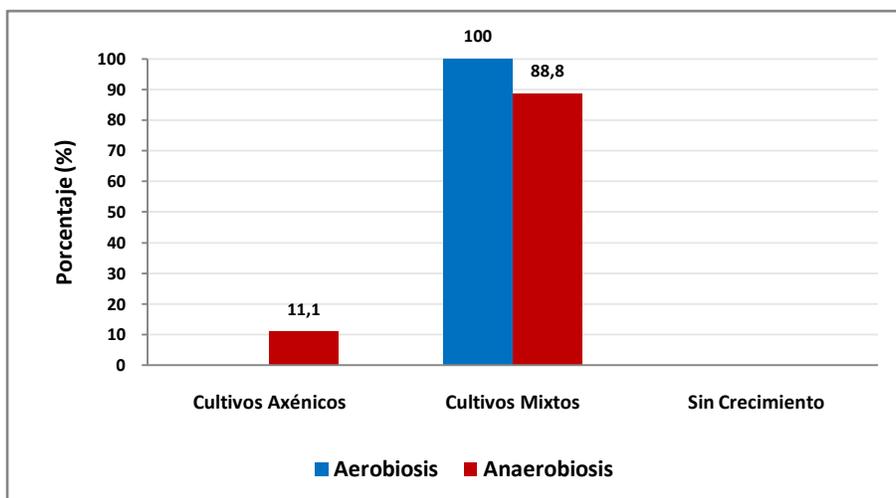


Figura 42. Porcentaje de cultivos axénicos y mixtos obtenidos en condiciones aeróbicas y anaeróbicas en el grupo de hembras de Otros Controles

4.7. Aislamientos en los Machos del Hospital Clínico Veterinario

En el grupo de MHCV se obtuvieron 10 aislamientos de microorganismos aeróbicos (41,7%), 12 aislamientos de microorganismos anaeróbicos facultativos (50%) y 2 aislamientos de microorganismos anaeróbicos estrictos (8,3%) (Figura 43).

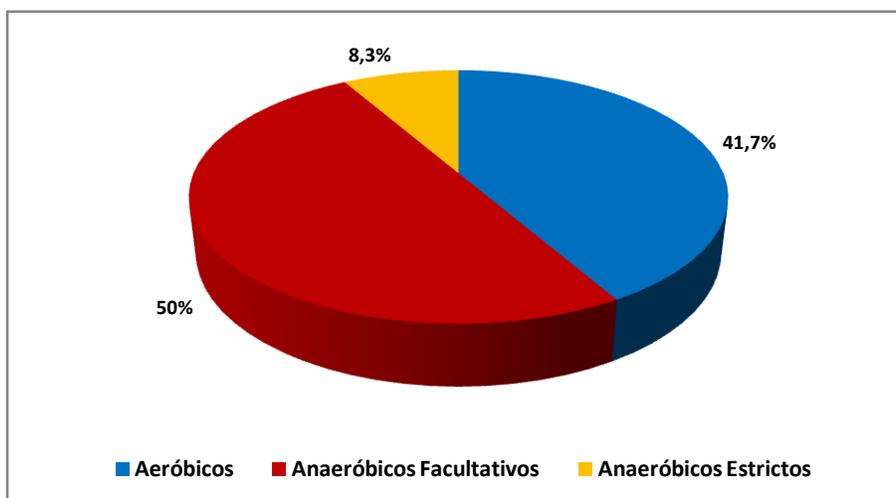


Figura 43. Porcentaje de microorganismos obtenidos en los grupos de Machos del Hospital Clínico Veterinario según el tipo de respiración.

Resultados

En el grupo de MHCV en condiciones aeróbicas, se obtuvo de número promedio 3,2 especies bacterianas (de 1 a 8 especies diferentes según la muestra) mientras que en condiciones anaeróbicas se obtuvo un número promedio de 2,4 especies bacterianas (de 0 a 5 especies diferentes según la muestra).

En condiciones aeróbicas, y en todas las muestras, tan solo se obtuvieron cultivos mixtos (Figura 44).

La combinación de bacterias que se aislaron con más frecuencia fue la formada por *Staphylococcus pseudintermedius* y *Escherichia coli* en 2 muestras (40% de los cultivos mixtos obtenidos en condiciones aeróbicas en el grupo de MHCV), seguidas por *Streptococcus* spp. no hemolíticos y *S. pseudintermedius* en otras 2 muestras (40%).

En condiciones anaeróbicas se obtuvo cultivo axénico en 1 de las muestras (20%) mientras que en las 4 restantes se obtuvieron cultivos mixtos (80%) (Figura 44). Se aisló en cultivo axénico una especie del género *Bacteroides*.

La combinación de bacterias que se aislaron con más frecuencia fue la formada por *Lactococcus* spp. y *Streptococcus* spp. β -hemolíticos en 2 muestras (50% de los cultivos mixtos en condiciones anaeróbicas del grupo MHCV).

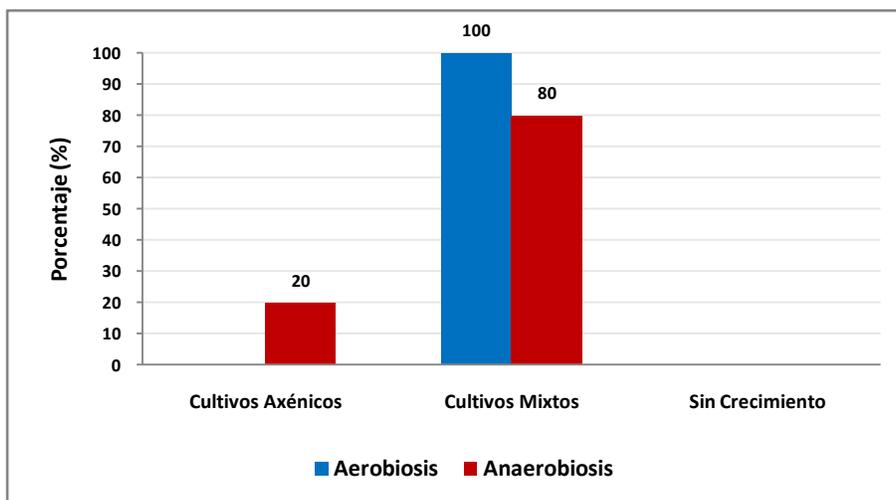


Figura 44. Porcentaje de cultivos axénicos y mixtos obtenidos en condiciones aeróbicas y anaeróbicas en el grupo de Machos del Hospital Clínico Veterinario.

5. Recuentos bacterianos en los animales con patología reproductiva

5.1. Resultados de los recuentos microbianos

En la Figura 45 se muestran todos los microorganismos aislados en la totalidad de muestras procedentes de hembras CSCR.

En el grupo formado por hembras con vaginitis se obtuvieron un total de 74 aislamientos bacterianos. La bacteria aislada con más frecuencia fue *Staphylococcus pseudintermedius* con 12 aislamientos (16,2% de los aislamientos totales del grupo vaginitis), seguida de *Lactococcus* spp. con 10 aislamientos (13,5%), *Proteus mirabilis* con 8 aislamientos (10,8%), *Streptococcus* spp. β -hemolíticos con otros 7 aislamientos (9,5%), *Bacillus* spp. con 7 aislamientos (9,5%) y *Streptococcus* spp. no hemolíticos con 6 aislamientos (8,1%) (Figura 46).

En las hembras con piometra se obtuvieron un total de 19 aislamientos. Los microorganismos aislados con más frecuencia fueron *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. β -hemolíticos, *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp. y *Acinetobacter* spp. con 2 aislamientos cada bacteria (10,5%) (Figura 46).

En los casos de hembras con vulvitis se obtuvieron un total de 7 aislamientos bacterianos. Las bacterias aisladas con más frecuencia fueron *S. pseudintermedius* y *Lactococcus* spp. con 2 aislamientos respectivamente (28,6% del total) (Figura 46).

Por último, en los casos de masa uterina solo se obtuvieron 3 aislamientos correspondientes a *Escherichia coli*, *S. pseudintermedius* y *Streptococcus* spp. β -hemolíticos (33,3% respectivamente) (Figura 46).

Resultados

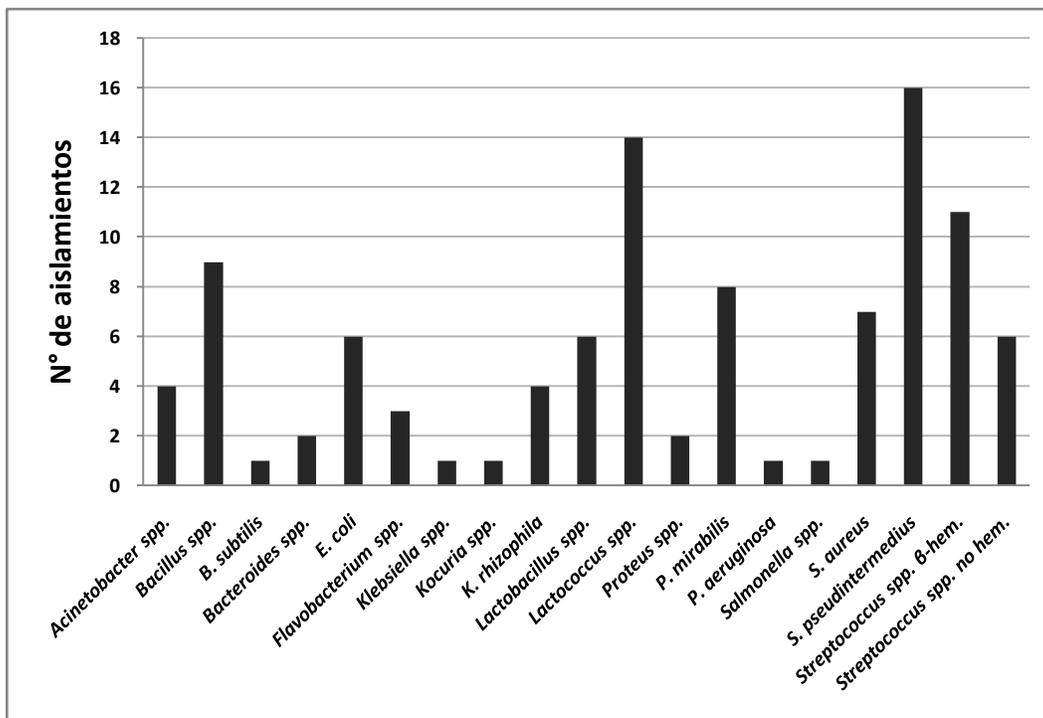


Figura 45. Número de aislamientos de los microorganismos aislados en las perras CSCR

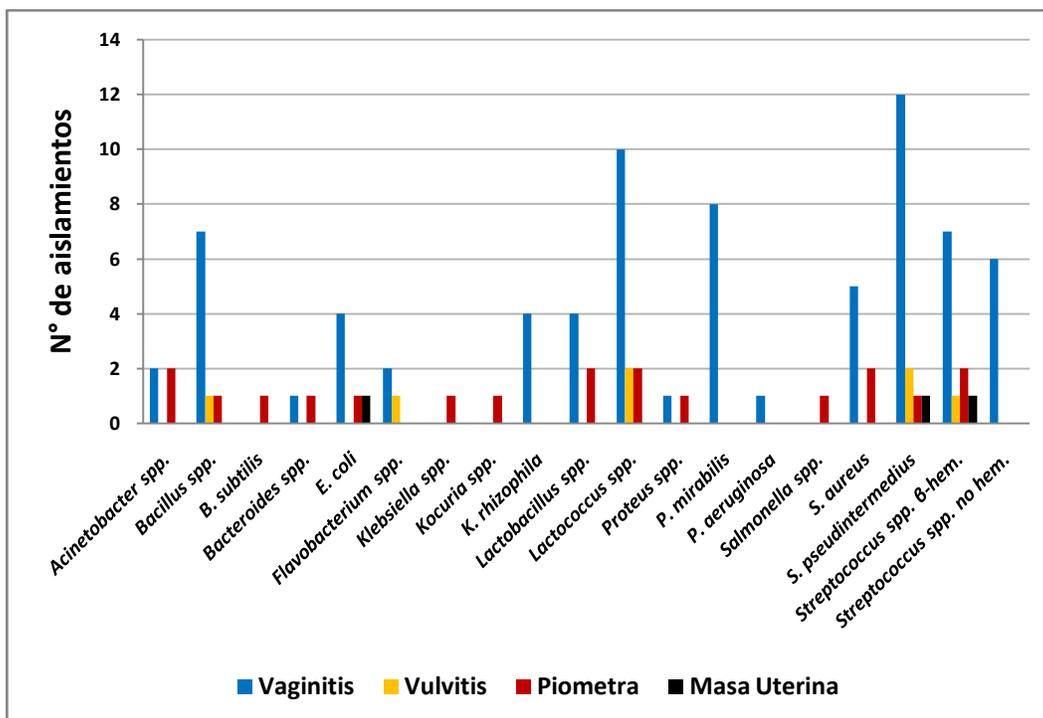


Figura 46. Recuento de los microorganismos en los subgrupos de hembras procedentes del grupo de animales Con Signos Clínicos Reproductivos.

El estudio estadístico realizado comparando los porcentajes de aislamientos de cada especie microbiana obtenidos en los grupos de hembras Con Signos Clínicos Reproductivos (Vaginitis, Vulvitis, Piometra y Masa Uterina) indicó que, a excepción de 4 casos, no existían diferencias entre las especies bacterianas aisladas.

En los porcentajes de aislamientos entre los casos de Piometra y Vaginitis se observan diferencias significativas ($P < 0,05$) en los aislamientos de *Bacillus subtilis*, *Klebsiella* spp., *Kocuria* spp. y *Salmonella* spp. El aislamiento de cada una de las especies microbianas nombradas en los casos de Piometra correspondió, cada una, al 5,3% de los aislamientos totales, mientras que en los casos de Vaginitis no se consiguieron aislar ningunas de estas especies (Figura 46).

5.2. Aislamientos en las Hembras con Vaginitis

En los casos de perras con vaginitis se obtuvieron un total de 32 aislamientos de microorganismos aeróbicos (43,2%), 41 aislamientos de microorganismos anaeróbicos facultativos (55,4%) y 1 aislamiento de un microorganismo anaeróbico estricto (1,4%) (Figura 47).

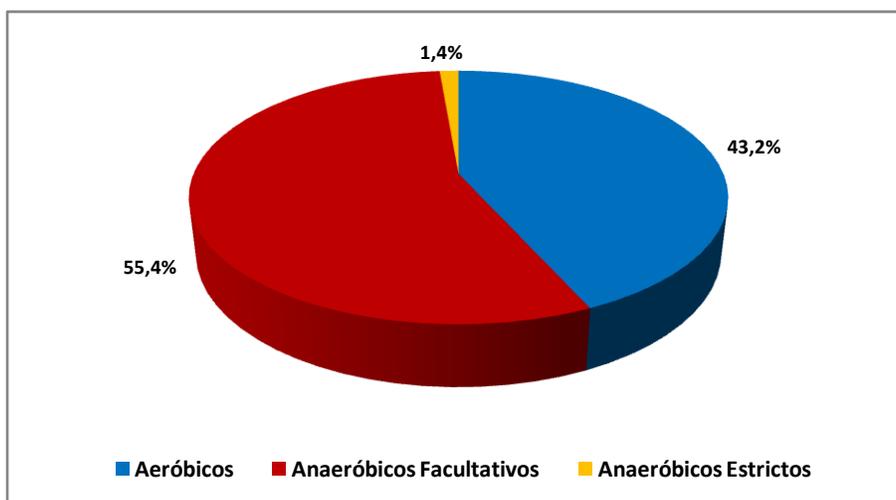


Figura 47. Porcentaje de microorganismos obtenidos en los casos de vaginitis según el tipo de respiración.

En las hembras con vaginitis en condiciones aeróbicas, se obtuvo de número promedio 3,5 especies bacterianas (de 1 a 6 especies diferentes según la muestra) mientras que en condiciones anaeróbicas se obtuvo un número promedio de 2,6 especies bacterianas (de 0 a 6 especies diferentes según la muestra).

En condiciones aeróbicas se obtuvieron cultivos axénicos en 2 muestras (11,1%) y cultivos mixtos en 16 muestras (88,9%) (Figura 48). *Escherichia coli* fue la bacteria que se aisló en cultivo axénico en ambas muestras.

La combinación de bacterias que se aislaron con más frecuencia fue la formada por *Staphylococcus pseudintermedius* y especies pertenecientes al género *Proteus* en 6 muestras (37,5% de los cultivos mixtos obtenidos en condiciones aeróbicas en casos de vaginitis), seguidas de *Streptococcus* spp. β -hemolíticos y *S. pseudintermedius* en 4 muestras (25%), *Lactococcus* spp. y *S. pseudintermedius* en otras 4 muestras (25%), *Streptococcus* spp. no hemolíticos y *S. pseudintermedius* en 3 muestras (18,8%) y *Streptococcus* spp. β -hemolíticos y especies del género *Proteus* en otras 3 muestras (18,8%).

En condiciones anaeróbicas se obtuvieron cultivos axénicos en 2 muestras (11,1%), cultivos mixtos en 15 muestras (83,3%) y en una de las muestras no se obtuvo crecimiento (5,6%) (Figura 48). *Escherichia coli* y una especie del género *Lactococcus* fueron las bacterias que se aislaron en cultivo axénico en una de las dos muestras respectivamente.

La combinación de bacterias que se aislaron con más frecuencia fue la formada por *Lactococcus* spp. y *Streptococcus* spp. β -hemolíticos en 4 muestras (28,6% de los cultivos mixtos obtenidos en condiciones anaeróbicas en los casos de vaginitis), seguidas de *Streptococcus* spp. β -hemolíticos y *Staphylococcus pseudintermedius* en 3 muestras (21,4%), *Lactococcus* spp. y *Streptococcus* spp. no hemolíticos en 3 muestras (21,4%), *Lactococcus* spp. y *S. pseudintermedius* en 3 muestras (21,4%), *Lactococcus* spp. y *Lactobacillus* spp. en 3 muestras (21,4%)

Resultados

y *Streptococcus* spp. β -hemolíticos y especies del género *Proteus* en otras 3 muestras (21,4%).

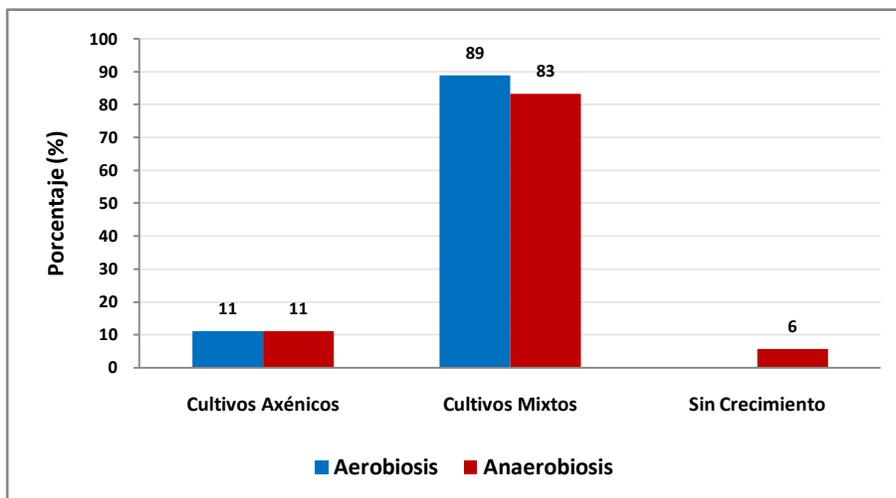


Figura 48. Porcentaje de cultivos axénicos y mixtos obtenidos en condiciones aeróbicas y anaeróbicas en las perras con vaginitis, del grupo Con Signos Clínicos Reproductivos.

5.3. Aislamientos en las Hembras con Vulvitis

En los casos de perras con vulvitis se obtuvieron un total de 5 aislamientos de bacterias aeróbicas (55,6%), 3 aislamientos de bacterias anaeróbicas facultativas (33,3%) y 1 aislamiento de una bacteria anaeróbica estricta (11,1%) (Figura 49).

Resultados

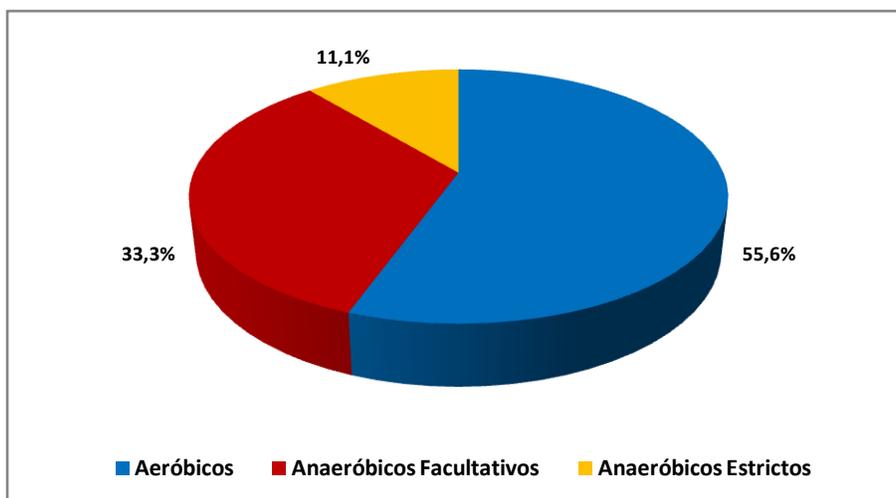


Figura 49. Porcentaje de microorganismos obtenidos en los casos de vulvitis según el tipo de respiración.

En las hembras con vulvitis en condiciones aeróbicas, se obtuvo de número promedio 4 especies bacterianas (4 especies diferentes en cada muestra) mientras que en condiciones anaeróbicas se obtuvo un número promedio de 2,5 especies bacterianas (de 1 a 4 especies diferentes según la muestra).

En condiciones aeróbicas no se obtuvo ningún cultivo axénico, tan sólo se obtuvieron cultivos mixtos (Figura 50).

La combinación de bacterias que se aislaron con más frecuencia fue la formada por *Staphylococcus pseudintermedius* y *Lactococcus* spp. en las 2 muestras (100% de los cultivos mixtos en el grupo de vulvitis).

En condiciones anaeróbicas se obtuvo un cultivo axénico de una muestra (50%) y un cultivo mixto en la muestra restante (50%) (Figura 50). Una especie perteneciente al género *Lactococcus* fue la bacteria aislada en cultivo axénico.

No se observaron combinaciones bacterianas frecuentes en cultivo mixto en condiciones anaeróbicas.

Resultados

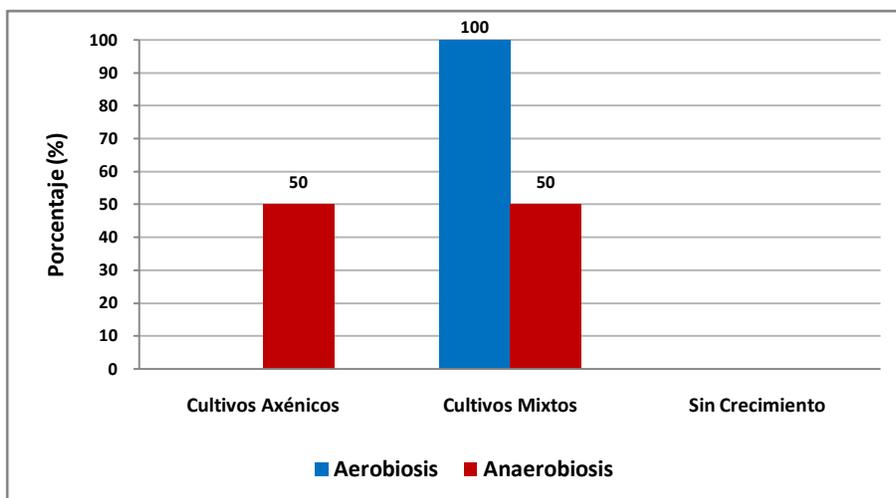


Figura 50. Porcentaje de cultivos axénicos y mixtos obtenidos en condiciones aeróbicas y anaeróbicas en las perras con vulvitis del grupo Con Signos Clínicos

5.4. Aislamientos en Hembras con Píometra

En las muestras de perras con píometra se obtuvieron un total de 7 aislamientos de microorganismos aeróbicos (41,2%) y 10 aislamientos de microorganismos anaeróbicos facultativos (58,8%) (Figura 51).

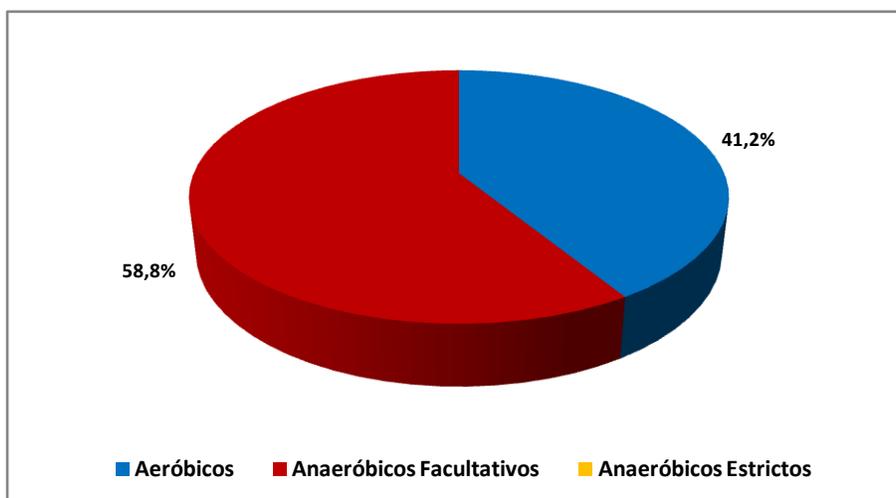


Figura 51. Porcentaje de microorganismos obtenidos en los casos de píometra según el tipo de respiración.

Resultados

En las hembras con piometra en condiciones aeróbicas, se obtuvo de número promedio 7 especies bacterianas (de 6 a 8 especies diferentes según la muestra) mientras que en condiciones anaeróbicas se obtuvo un número promedio de 2 especies bacterianas (2 especies diferentes en cada muestra).

Tanto en condiciones aeróbicas como en condiciones anaeróbicas tan solo se obtuvieron cultivos mixtos en las dos muestras (Figura 52).

No se observaron combinaciones bacterianas frecuentes en cultivo mixto ni en condiciones aeróbicas ni en condiciones anaeróbicas.

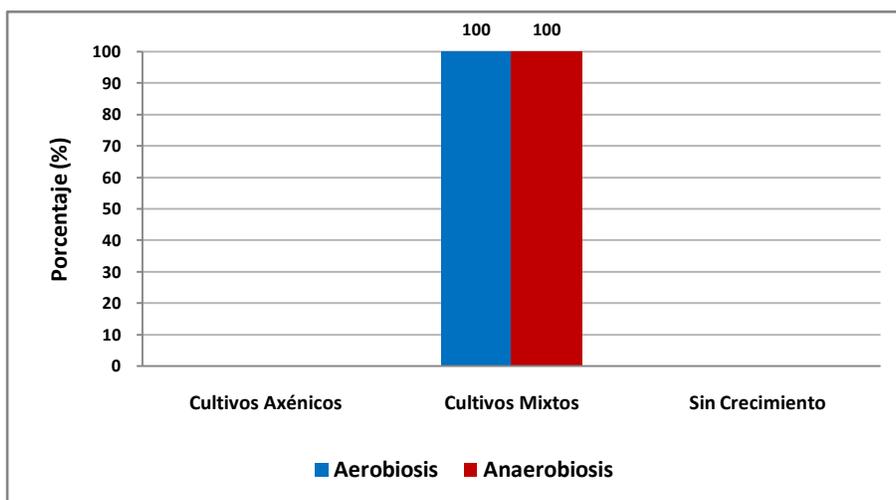


Figura 52. Porcentaje de cultivos axénicos y mixtos obtenidos en condiciones aeróbicas y anaeróbicas en las perras con piometra del grupo CSCR.

5.5. Aislamientos en la Hembras con Masa Uterina

En el caso de la perra con masa uterina se obtuvo 1 aislamiento de una bacteria aeróbica (33,3%) y 2 aislamientos de bacterias anaeróbicas facultativas (66,7%) (Figura 53).

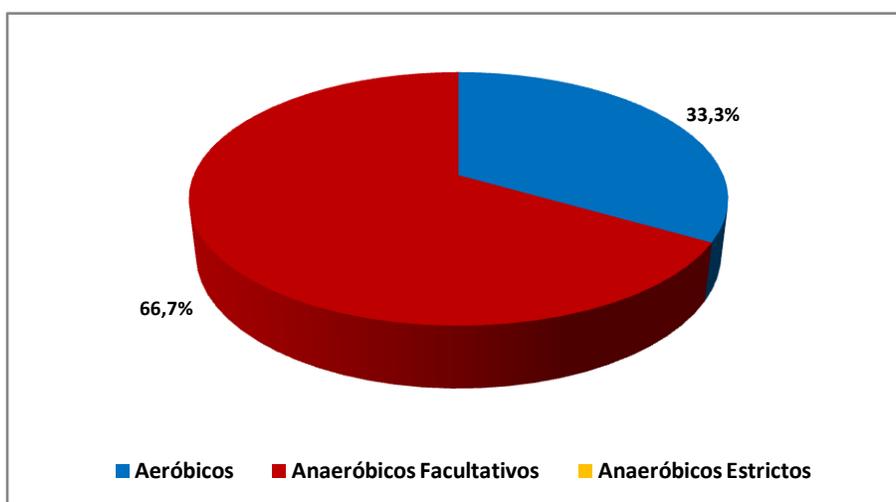


Figura 53. Porcentaje de microorganismos obtenidos en los caso de masa uterina según el tipo de respiración.

En las hembras con masa uterina en condiciones aeróbicas, se obtuvo de número promedio 3 especies bacterianas (3 especies diferentes en la muestra) mientras que en condiciones anaeróbicas se obtuvo un número promedio de 1 especies bacterianas (1 única especie bacteriana en la muestra).

En condiciones aeróbicas tan solo se obtuvo un cultivo mixto en la única muestra obtenida, mientras que en condiciones anaeróbicas se obtuvo un cultivo axénico identificado como una especies perteneciente al género *Streptococcus* β -hemolítico (Figura 54). No se observaron combinaciones bacterianas frecuentes en cultivo mixto ni en condiciones aeróbicas ni en condiciones anaeróbicas.

Resultados

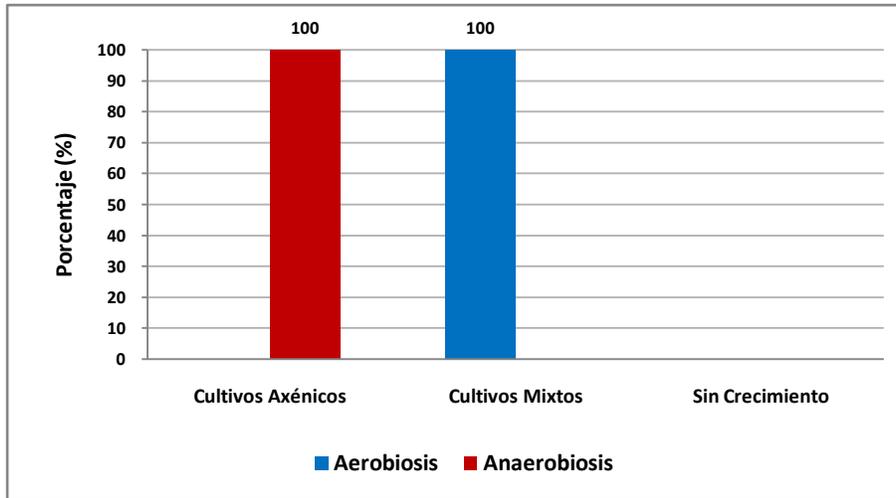


Figura 54. Porcentaje de cultivos axénicos y mixtos obtenidos en condiciones aeróbicas y anaeróbicas en la perra con masa uterina del grupo CSCR

6. Resultados de la conservación de las cepas aisladas

6.1. Resultados de la viabilidad de los liófilos

Como paso previo a la liofilización se calculó la concentración de microorganismos con la que se partía antes de la conservación. En el caso de *Lactobacillus curvatus* la concentración fue de $8,60 \cdot 10^7$ UFC/mL. En cuanto a *Staphylococcus aureus* fue de $3,10 \cdot 10^8$ UFC/mL y para *Escherichia coli* de $2,33 \cdot 10^8$ UFC/mL (Figura 55).

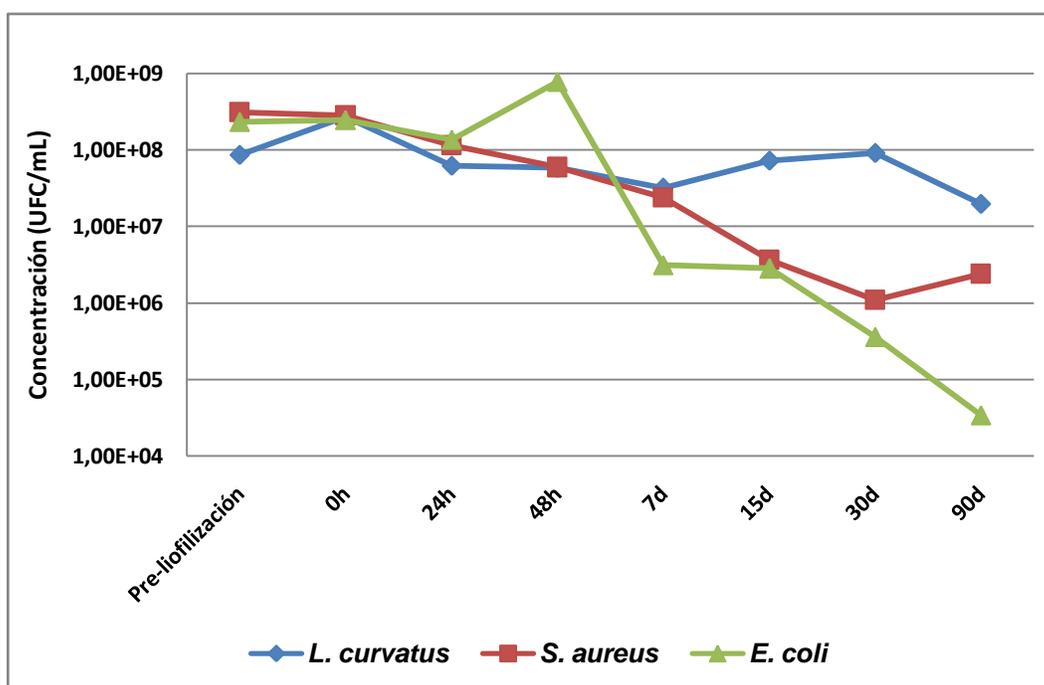


Figura 55. Concentraciones (UFC/mL) recuperadas en diferentes períodos de tiempo de los microorganismos conservados mediante liofilización.

Resultados

Pasados los 90 días de conservación se procedió a la recuperación de los microorganismos. De *Lactobacillus curvatus* se recuperó una concentración de $1,96 \cdot 10^7$ UFC/mL, de *S. aureus* $2,40 \cdot 10^6$ UFC/mL y de *E. coli* $3,40 \cdot 10^4$ UFC/mL (Figura 55). Entre las concentraciones de microorganismos recuperadas en el total de los tiempos no se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) (Figura 56).

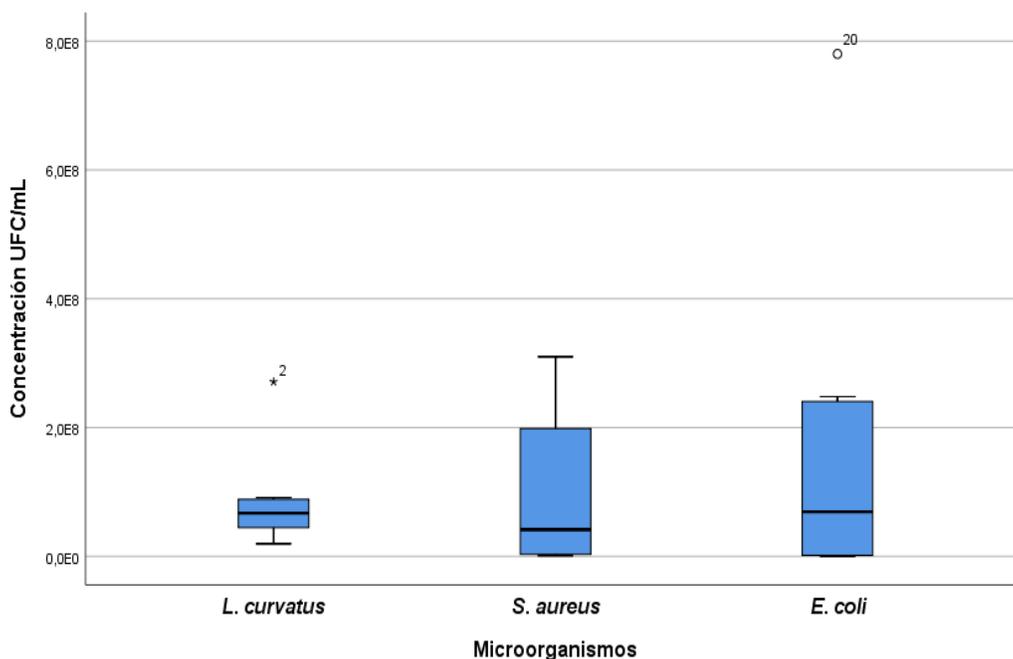


Figura 56. Diagrama de cajas de la concentración recuperada de cada una de las bacterias conservadas mediante liofilización.

(*): Valor superior a la altura de la caja multiplicada por 3 o valor extremo correspondiente a la muestra n°2 con un valor de $2,71 \cdot 10^8$ UFC/mL.

(°): Valor fuera de los bigotes de las cajas o caso atípico correspondiente a la muestra n°20 con un valor de $1,12 \cdot 10^9$ UFC/mL.

De las tres especies microbianas, *Lactobacillus curvatus* fue la bacteria que se mantuvo más estable mediante liofilización, disminuyendo su concentración una unidad logarítmica a lo largo de los 90 días (Figura 55).

6.2. Resultados de la viabilidad de las crioperlas

Las concentraciones recuperadas a lo largo del tiempo de las especies microbianas conservadas en crioperlas se muestran en la Figura 57.

Del mismo modo que en la liofilización, antes de llevar a cabo la crioconservación, se calcularon las concentraciones de microorganismos de las cuales partimos. En el caso de *Lactobacillus curvatus*, la concentración fue de $1,09 \cdot 10^4$ UFC/mL, en *Staphylococcus aureus* fue de $1,05 \cdot 10^5$ UFC/mL y en *Escherichia coli* de $7,02 \cdot 10^4$ UFC/mL (Figura 57).

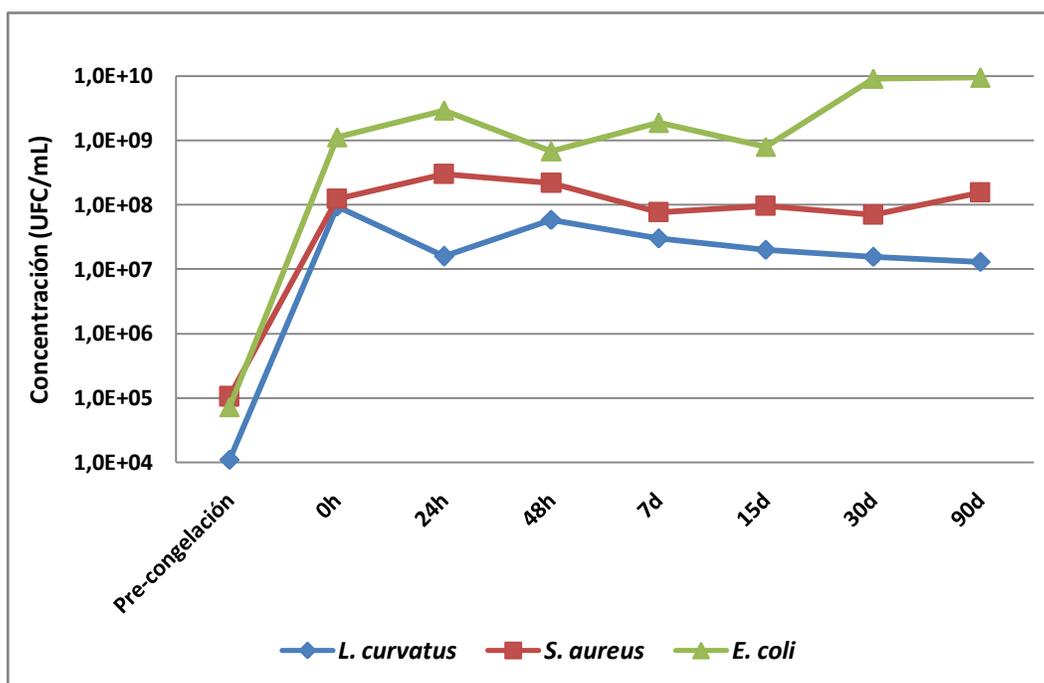


Figura 57. Concentraciones (UFC/mL) recuperadas en diferentes períodos de tiempo de los microorganismos conservados mediante crioperlas.

Entre las concentraciones de microorganismos recuperadas en los diferentes periodos de tiempo sí se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre *Escherichia coli* y las dos bacterias restantes. Sin embargo, entre *Staphylococcus aureus* y *Lactobacillus curvatus* no se observaron diferencias significativas entre las concentraciones recuperadas en los diferentes períodos de tiempo (Figura 58).

Resultados

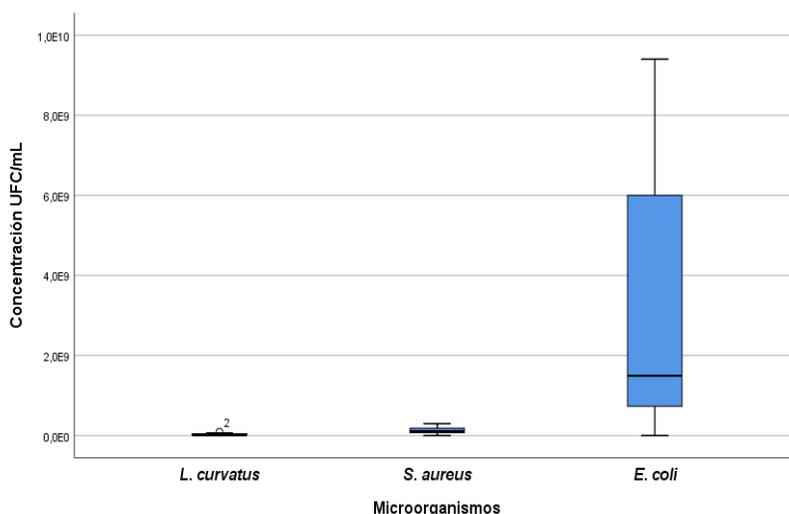


Figura 58. Diagrama de cajas de la concentración recuperada de cada una de las bacterias conservadas mediante criopreservación.
(°): Valor fuera de los bigotes de las cajas o caso atípico correspondiente a la muestra n°2 con un valor de $9,4 \cdot 10^9$ UFC/mL.

En el caso de las crioperlas entre el tiempo de pre-congelación y el tiempo 0 horas se observó un incremento significativo en la concentración de los tres microorganismos (Figura 57).

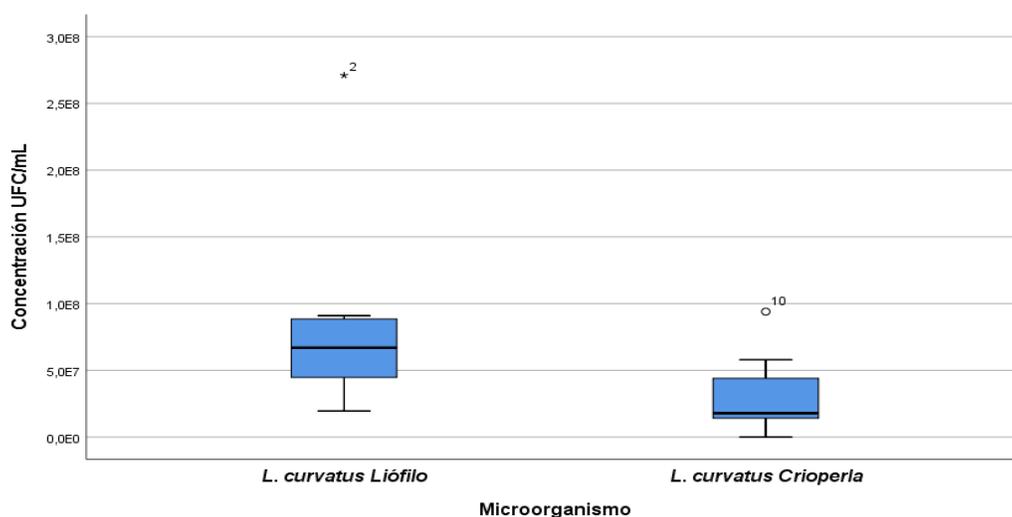
Pasados los 90 días de criopreservación, se procedió a la recuperación de los microorganismos. De *L. curvatus* se recuperó una concentración de $1,30 \cdot 10^7$ UFC/mL, de *S. aureus* un $1,56 \cdot 10^8$ UFC/mL y de *E. coli* un $9,40 \cdot 10^9$ UFC/mL.

De las tres especies microbianas, *Escherichia coli* fue la bacteria que se mantuvo en una concentración más elevada conservada en crioperlas a lo largo del tiempo. Se observó una estabilidad en la concentración de las tres bacterias a lo largo de los 90 días.

6.3. Comparación entre métodos de conservación

Comparando las concentraciones recuperadas en los diferentes tiempos entre la liofilización y crioconservación dentro de una misma especie microbiana, se recuperó una concentración de *Escherichia coli* significativamente inferior ($P < 0,05$) entre los tiempos 7 y 90 días en la liofilización en comparación a la recuperada a partir de las crioperlas (Figura 59A y B). Por el contrario, en *Staphylococcus aureus* y *Lactobacillus curvatus* no se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) en las concentraciones recuperadas entre ambos métodos de conservación (Figura 59C).

A

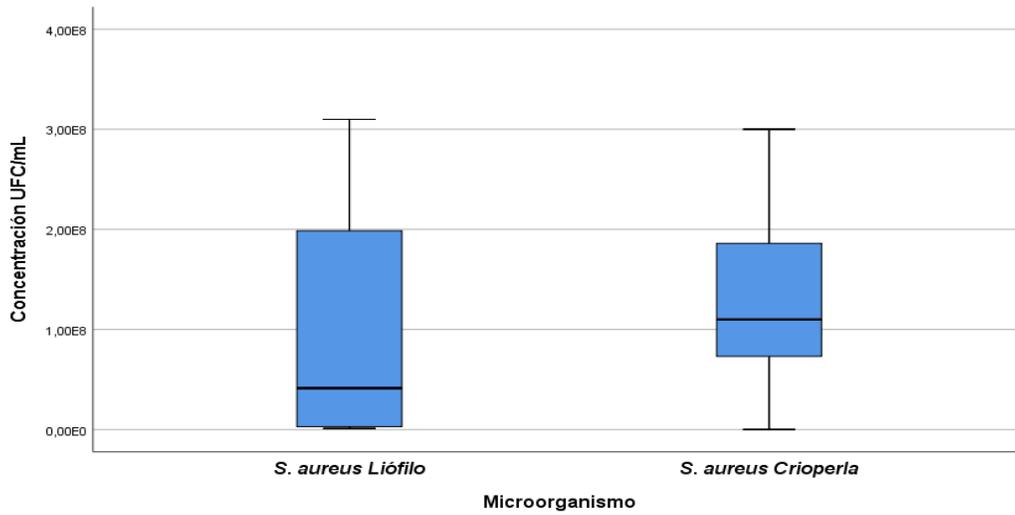


(*): Valor superior a la altura de la caja multiplicada por 3 o caso extremo correspondiente a la muestra n°2 con un valor de $2,71 \cdot 10^8$ UFC/mL.

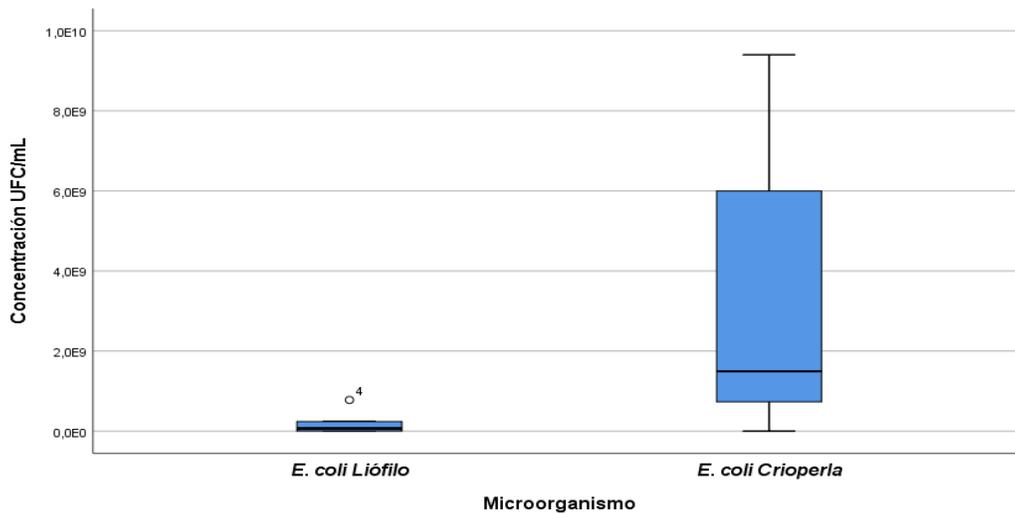
(°): Valor fuera de los bigotes de las cajas o caso atípico correspondiente a la muestra n°10 con un valor de $1,12 \cdot 10^9$ UFC/mL.

Resultados

B



C



(⁴): Valor fuera de los bigotes de las cajas o caso atípico correspondiente a la muestra n^o4 con un valor de $7,8 \cdot 10^8$ UFC/mL.

Figura 59. Diagramas de cajas en relación a la comparación de las concentraciones obtenidas en las mismas especies microbianas según el método de conservación. A: Concentración obtenida en *Lactobacillus curvatus* en liófilos y crioperlas; B: Concentración obtenida en *Staphylococcus aureus* en liófilos y crioperlas; C: Concentración obtenida en *Escherichia coli* en liófilos y crioperlas.

7. Potencial probiótico de las bacterias ácido lácticas

7.1. Resultados de la selección de cepas BAL potencialmente probióticas

7.1.1. Características de las cepas preseleccionadas

Una vez terminados los aislamientos e identificaciones de las bacterias procedentes de las muestras de nuestro estudio, se llevaron a cabo las pruebas preliminares para pre-seleccionar las bacterias ácido lácticas con posible potencial probiótico.

Las características de cada una de las cepas BAL se encuentran detalladas en la Tabla 16. Todas las bacterias pre-seleccionadas fueron Gram positivas, dieron resultados negativos para la prueba de la catalasa y no se observaron bacterias formadoras de esporas.

Siguiendo los criterios de selección de BAL (consultar apartado 5.1. Identificación de las bacterias ácido lácticas), no se descartó ninguna de las bacterias pre-seleccionadas.

Las cepas potencialmente probióticas preseleccionadas que pertenecían a la misma especie bacteriana recibieron un orden numérico para su distinción dado que algunas de ellas coincidían tanto en género como en especie.

Resultados

Tabla 16. Características principales de las cepas preseleccionadas como bacterias potencialmente probióticas.

Cepa BAL	Condiciones de crecimiento	Gram	Catalasa	Morfología	Tinción de esporas
<i>Lactobacillus curvatus 1</i>	AN, 37°C	Positivo	Negativo	Bacilar	Negativa
<i>Pediococcus acidilactici</i>	MAE 5% CO ₂ , 37°C	Positivo	Negativo	Cocos en parejas	Negativa
<i>Lactobacillus curvatus 2</i>	AN, 37°C	Positivo	Negativo	Bacilar	Negativa
<i>Lactobacillus curvatus 3</i>	AN, 37°C	Positivo	Negativo	Bacilar	Negativa
<i>Lactococcus lactis1</i>	AN, 37°C	Positivo	Negativo	Cocos en cadenas	Negativa
<i>Lactobacillus brevis</i>	MAE 5% CO ₂ , 37°C	Positivo	Negativo	Bacilar	Negativa
<i>Lactobacillus plantarum 1</i>	AE, 37°C	Positivo	Negativo	Bacilar	Negativa
<i>Lactococcus lactis 2</i>	MAE 5% CO ₂ , 37°C	Positivo	Negativo	Cocos en cadenas	Negativa
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	AE, 37°C	Positivo	Negativo	Bacilar	Negativa
<i>Lactobacillus plantarum 2</i>	AE, 37°C	Positivo	Negativo	Bacilar	Negativa
<i>L. paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>	AN, 37°C	Positivo	Negativo	Bacilar	Negativa
<i>L. delbrueckii</i> spp. <i>delbrueckii</i>	MAE 5% CO ₂ , 37°C	Positivo	Negativo	Bacilar	Negativa
<i>Lactobacillus plantarum 3</i>	AE, 37°C	Positivo	Negativo	Bacilar	Negativa

AE: aerobiosis; AN: Anaerobiosis; MAE: Microaerofilia

7.2. Resultados de la evaluación de la seguridad de las cepas preseleccionadas

7.2.1. Resultados del análisis de la sensibilidad a los antibióticos

Los antibióticos utilizados para el análisis de sensibilidad fueron aquellos que establece la *European Food Safety Authority* (EFSA) para la selección de posibles probióticos y se detallan en la Tabla 11 (apartado 5.2.1. Determinación de la seguridad de las cepas con potencial probiótico).

En los resultados de los análisis a los antibióticos para la selección de posibles probióticos, los microorganismos que mostraron mejores resultados fueron *Lactobacillus curvatus* 1, *Lactococcus lactis* 1, *Lactobacillus plantarum* 1, *Lactobacillus plantarum* 2, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *delbrueckii* y *Lactobacillus plantarum* 3. Los resultados del test de sensibilidad para cada una de las cepas con cada uno de los antibióticos se muestran en la Tabla 17.

Resultados

Tabla 17. Evaluación de la sensibilidad a los antibióticos requeridos por la EFSA según los probióticos preseleccionados.

Bacterias ácido lácticas	Sensibilidad a los antibióticos								
	AMP	K	CD	VA	S	TE	GN	E	C
<i>Lactobacillus curvatus 1</i>	S	S	S	n.r	S	S	S	S	S
<i>Pediococcus acidilactici</i>	S	R	S	n.r	S	S	R	S	S
<i>Lactobacillus curvatus 2</i>	S	R	R	n.r	R	S	R	R	R
<i>Lactobacillus curvatus 3</i>	S	R	R	n.r	R	S	R	R	S
<i>Lactococcus lactis 1</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Lactobacillus brevis</i>	S	R	R	n.r	R	S	R	S	S
<i>Lactobacillus plantarum 1</i>	S	S	S	n.r	n.r	S	S	S	S
<i>Lactococcus lactis 2</i>	S	R	S	R	R	S	R	S	S
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	S	R	R	n.r	S	S	S	S	S
<i>Lactobacillus plantarum 2</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>L. paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>	S	R	S	n.r	R	S	R	S	S
<i>L. delbrueckii</i> spp. <i>delbrueckii</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Lactobacillus plantarum 3</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S

AMP: Ampicilina; K: Kanamicina; CD: Clindamicina; VA: Vancomicina; S: Estreptomina; TE: Tetraciclina; GN: Gentamicina; E: Eritromicina; C: Cloramfenicol; n.r: no requerido; S: Cepa sensible; R: Cepa resistente.

7.2.2. Resultados de la evaluación de la capacidad hemolítica

La actividad hemolítica es una característica patogénica que no pueden tener las bacterias probióticas. Observando los resultados de la evaluación de la capacidad hemolítica mediante la siembra de las BAL en agar Columbia + 5% de sangre de cordero (Bio-Rad Laboratories, USA) no se detectó ninguna cepa β -hemolítica por lo que no se descartó ningún microorganismo (Tabla 18).

Tabla 18. Resultados de la evaluación de la capacidad hemolítica de las cepas preseleccionadas potencialmente probióticas.

Cepas BAL	Tipo de hemólisis
<i>Lactobacillus curvatus</i> 1	α -hemólisis
<i>Pediococcus acidilactici</i>	α -hemólisis
<i>Lactobacillus curvatus</i> 2	α -hemólisis
<i>Lactobacillus curvatus</i> 3	α -hemólisis
<i>Lactococcus lactis</i> 1	α -hemólisis
<i>Lactobacillus brevis</i>	γ -hemólisis
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	α -hemólisis
<i>Lactococcus lactis</i> 2	α -hemólisis
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	γ -hemólisis
<i>Lactobacillus plantarum</i> 2	α -hemólisis
<i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>	γ -hemólisis
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>delbrueckii</i>	γ -hemólisis
<i>Lactobacillus plantarum</i> 3	α -hemólisis

7.3. Evaluación de la resistencia a las condiciones gastrointestinales

Obtenidos los resultados de las características generales, la evaluación a la sensibilidad a los antibióticos y la capacidad hemolítica, se seleccionaron solamente 6 de las 13 cepas BAL potencialmente probióticas preseleccionadas para la evaluación de la resistencia a las condiciones físico-químicas gastrointestinales (Tabla 19). Las 6 bacterias seleccionadas para la siguiente evaluación fueron: *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus curvatus* 1, *Lactobacillus plantarum* 1, *Lactobacillus plantarum* 2, *Lactobacillus delbrueckii* y *Lactobacillus plantarum* 3.

Se seleccionaron como resistentes a las condiciones gastrointestinales las cepas que presentaron las características descritas en el apartado 5.2.2. Evaluación de la resistencia a las condiciones gastrointestinales (pág.76).

Todas y cada una de las 6 cepas potencialmente probióticas mostraron resistencia a las condiciones gastrointestinales (Tabla 19).

Tabla 19. Resultados de la evaluación de la resistencia a las condiciones gastrointestinales de las cepas potencialmente probióticas.

Cepas BAL	Lisozima (µg/mL)	Sales biliares (%p/v)	Peróxido de hidrógeno (µg/mL)	pH	Resistencia <i>in vitro</i> a las condiciones GI
<i>L. lactis</i>	>300	>1	>30	<2	Sí
<i>L. curvatus</i> 1	>300	>1	>30	<2	Sí
<i>L. plantarum</i> 1	>300	0,5-1	>30	<2	Sí
<i>L. plantarum</i> 2	>300	>1	>30	<2	Sí
<i>L. delbrueckii</i>	>300	0,5-1	>30	<2	Sí
<i>L. plantarum</i> 3	>300	>1	>30	<2	Sí

7.4. Resultados de la actividad antimicrobiana de las cepas BAL

Los resultados obtenidos de la evaluación de la actividad antimicrobiana de las cepas BAL seleccionadas mediante las dos modificaciones de la técnica en difusión en disco de Kirby Bauer se muestran en la Tabla 20.

Las bacterias que mostraron mejores resultados inhibitorios frente a las bacterias con potencial patógeno fueron *Lactobacillus plantarum* 1 y *Lactobacillus plantarum* 2 ya que, al menos en la segunda modificación del método de Kirby Bauer, fueron capaces de inhibir a las 12 bacterias con potencial patógeno (en la primera modificación ninguna de las dos cepas consigue inhibir *Salmonella tiphymurium*).

También se observó que en la primera modificación de la técnica en difusión en disco de Kirby Bauer se obtenían menos inhibiciones que en la segunda modificación. Un claro ejemplo es el caso de *Lactococcus lactis* que en la primera modificación del método de Kirby Bauer es capaz de inhibir a los 12 microorganismos con potencial patógeno, sin embargo, en la primera modificación del método de Kirby Bauer no tuvo la capacidad de inhibir a *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Proteus* spp. ni a *Bacillus cereus*. Razón por la que no se seleccionó junto a *L. plantarum* 1 y *L. plantarum* 2.

Tabla 20. Resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana de las cepas BAL contra los 12 microorganismos potencialmente patógenos seleccionados.

BAL	<i>L. plantarum 1</i>		<i>L. lactis</i>		<i>L. plantarum 2</i>		<i>L. curvatus 1</i>		<i>L. delbrueckii</i>		<i>L. plantarum 3</i>	
	Disco	Directo	Disco	Directo	Disco	Directo	Disco	Directo	Disco	Directo	Disco	Directo
<i>Kocuria</i> spp.	I	I	I	I	I	I	N.I	I	I	I	I	I
<i>P. aeruginosa</i>	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	N.I	I
<i>B. subtilis</i>	I	I	N.I	I	I	I	I	I	N.I	N.I	N.I	N.I
<i>E. coli</i>	I	I	N.I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
<i>Proteus</i> spp.	I	I	N.I	I	I	I	N.I	I	I	I	I	I
<i>S. aureus</i>	I	I	I	I	I	I	N.I	I	I	I	I	I
<i>E. faecalis</i>	I	I	I	I	I	I	I	I	N.I	I	N.I	I
<i>Streptococcus</i> spp.	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
<i>S. tiphymurium</i>	N.I	I	I	I	N.I	I	I	N.I	I	I	I	I
<i>B. cereus</i>	I	I	N.I	I	I	I	I	I	N.I	N.I	N.I	I
<i>L. monocytogenes</i>	I	I	I	I	I	I	I	I	N.I	I	I	I
<i>L. innocua</i>	I	I	I	I	I	I	N.I	I	N.I	I	I	I

Disco: Primera modificación del método de Kirby Bauer. Directo: Segunda modificación del método de Kirby Bauer. I: Inhibición; N.I: No inhibió

Discusión

1. Discusión de las identificaciones bacterianas

La microbiota de la mucosa vaginal y prepucial del perro se caracteriza por estar compuesta por una amplia diversidad microbiana (Bjurström y Linde-Forsberg, 1992; Feyen *et al.*, 2004; Laurusevicius *et al.*, 2008; Hutchins *et al.*, 2014). Entre las especies microbianas que se pueden identificar se hallan especies de respiración tanto aeróbica como anaeróbica (Baba *et al.*, 1983). En el estudio realizado por Olson *et al.* (1986) indican que aproximadamente el 60% de la microbiota de la vagina craneal está formada por microorganismos aeróbicos mientras que en la zona de la vagina caudal está formada por microorganismos aeróbicos en el 90%. En el estudio realizado por Hutchins *et al.* (2014) consiguen aislar microorganismos aeróbicos de la gran mayoría de perros (19 de 21 perros del grupo a estudiar y en 18 de 23 perros del grupo control). En cuanto a la microbiota anaeróbica existe muy poca bibliografía que nos permita coger sus resultados como referente. En nuestro estudio, a diferencia de los nombrados anteriormente, hemos obtenido crecimientos de una amplia diversidad microbiana tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, salvo en un total de 7 muestras (2 procedentes de los Núcleos Zoológicos y 5 del Hospital Clínico Veterinario) en las que no se han obtenido crecimientos en condiciones anaeróbicas. En cuanto a tipo de respiración microbiana, en nuestro estudio han predominado los microorganismos de respiración anaeróbica facultativa (61,1% de los aislamientos) lo que difiere con los resultados obtenidos por Olson *et al.* (1986) y Hutchins *et al.* (2014) en los que aíslan, en su mayoría, microorganismos aeróbicos.

2. Discusión de los aislamientos bacterianos globales de los animales estudiados

2.1. Discusión de los recuentos microbianos

En ocasiones, los propietarios pueden solicitar un cultivo vaginal libre de bacterias antes del apareamiento. Desde el punto de vista microbiológico, esta es una petición sin sentido pues, según van Duijkeren (1992), la mucosa vaginal no es un ambiente estéril y es prácticamente imposible no obtener crecimientos en placa a partir de un cultivo vaginal. Por lo tanto, la obtención de cultivos microbianos tras una siembra de una muestra vaginal no siempre es indicativa de algún tipo de infección o patología. Los resultados obtenidos en el desarrollo de nuestra investigación confirman que tanto la mucosa vaginal como la prepucial no son ambientes estériles, ya que se han podido aislar como mínimo una especie bacteriana en el 100% de los perros muestreados, tanto en machos como en hembras.

Muchos estudios coinciden que el microorganismo aislado con más frecuencia de muestras genitales es *Escherichia coli* (Hirsh, 1977; Ling 1978; Olson, 1978; Van duijkeren, 1992). En el estudio de Laurusevicius *et al.* (2008) observan que el microorganismo aislado con más frecuencia es *Staphylococcus* spp. (en el 57,6% de las muestras). En el estudio realizado por Hutchins *et al.* (2014) el microorganismo aislado con más frecuencia es *Staphylococcus pseudintermedius* (en 13 de 44 muestras) seguido de *Escherichia coli* (en 11 de 44 muestras). Los resultados de los estudios anteriores coinciden con los que hemos obtenido en nuestro trabajo, ya que *Staphylococcus pseudintermedius* (13,4% de los aislamientos totales) y *Escherichia coli* (11,4%) son de los microorganismos aislados con más frecuencia en las muestras procesadas.

De acuerdo con el estudio de Bjurström y Linde-Forsberg (1992), la microbiota vaginal y prepucial tienen la misma composición en los animales que conviven en el mismo entorno. También es posible encontrar similitudes en la microbiota

entre hembras de la misma raza y se observa que, a menudo, se da la transferencia de bacterias durante el apareamiento y sin influencias sobre la fertilidad del macho o de la hembra. En nuestro estudio elegimos incluir tres grupos de animales que conviviesen en el mismo entorno (Núcleos Zoológicos) para determinar si la composición entre machos y hembras de un mismo hábitat, como se comentará más adelante en Discusión.

Varios estudios afirman que se pueden aislar las mismas especies microbianas tanto de animales sanos como de animales que presenten alteraciones reproductivas o enfermedades del tracto genitourinario (Bjurström, 1993; Feyen *et al.*, 2004; Hutchins *et al.*, 2014). No obstante, en los estudios realizados por van Duijkren (1992), Bjurström (1993) y Root Kustritz (2006), se obtienen recuentos bacterianos más elevados en animales con problemas de infertilidad con el predominio de una a dos especies microbianas. En nuestro estudio elegimos incluir dentro del segundo bloque de estudio animales con signos clínicos reproductivos (CSCR) y más animales sanos como el grupo de Hembras en Celo (HC), el grupo de hembras para Otros Controles Reproductivos (OCR) y el grupo formado por Machos del Hospital Clínico Veterinario (MHCV). Estas agrupaciones nos han permitido comparar las especies bacterianas aisladas entre animales sanos y enfermo como se comentará más adelante en Discusión.

Conocer la microbiota de la mucosa vaginal y del prepucio de animales sanos es importante para reducir los tratamientos con antibióticos que los criadores realizan antes del apareamiento o en fechas cercanas del parto. El uso indiscriminado de antibióticos puede tener un efecto perjudicial que afecta directamente al equilibrio de la microbiota genital (Groppetti *et al.*, 2012). Una administración en exceso de antibióticos, además de ser perjudicial para la salud del animal, podría aumentar la resistencia a los antibióticos. Los estudios realizados por Roja *et al.* (2011) y Groppetti *et al.* (2012) han confirmado que el uso excesivo de antibióticos selecciona cepas resistentes y que la transferencia de estas bacterias resistentes podría ocurrir horizontalmente, de perro a perro, especialmente entre machos y hembras.

Asimismo, debe tenerse en cuenta que los cambios hormonales producen variaciones cualitativas y cuantitativas en la microbiota vaginal durante el ciclo estral, como se ha demostrado en varios estudios (Bjurström y Linde-Forsberg 1992; Watts *et al.*, 1996; Günzel-Apel *et al.*, 1999; Feyen *et al.*, 2004; Laurusevicius *et al.*, 2008; Saritas *et al.*, 2010). Por esta razón, es aconsejable tomar muestras para el cultivo vaginal durante el anestro (van Duijkeren, 1992).

En nuestro estudio elegimos incluir un bloque de animales solo con perros castrados (Núcleos Zoológicos) para excluir un posible efecto hormonal y obtener una muestra más homogénea, lo que ha permitido comparar entre especies bacterianas aisladas de animales de ambos sexos de forma más efectiva, como se comentará más adelante en Discusión. Del mismo modo se han incluido bloques de animales que en su totalidad provienen de perras sin castrar, incluyendo hembras con patología del tracto genitourinario (CSCR, HC y OCR) como se comentará más adelante en Discusión. Partiendo de estas dos situaciones, debemos considerar que los resultados puedan ser consecuencia del efecto hormonal y/o influenciado por la propia patología del animal.

2.2. Discusión de los porcentajes de los microorganismos aislados según el tipo de respiración

En nuestro estudio, independientemente de las condiciones de incubación, los 640 aislamientos microbianos obtenidos se clasificaron según el tipo de respiración predominando los microorganismos de respiración anaeróbica facultativa (391 aislamientos) frente a los microorganismos de respiración aeróbica (231 aislamientos) y de respiración anaeróbica estricta (18 aislamientos). Esta clasificación de los microorganismos procedentes de la microbiota genital sale del esquema habitual en anteriores estudios en los que tan solo se hace hincapié en las condiciones de incubación.

2.3. Discusión del Porcentaje de cultivos axénicos y mixtos

De los crecimientos obtenidos en el 100% de las muestras han predominado los cultivos mixtos sobre los cultivos axénicos tanto en los crecimientos obtenidos en condiciones aeróbicas (8 cultivos axénicos y 127 cultivos mixtos) como anaeróbicas (22 cultivos axénicos y 106 cultivos mixtos). Este hecho no ocurre en el estudio realizado por Groppetti *et al.* (2012) en el que, en condiciones aeróbicas, los cultivos axénicos se obtienen en el 76,5% de los cultivos y los mixtos en el 23,5% (no se indican resultados en condiciones anaeróbicas). Sin embargo, en el estudio de Hutchins *et al.* (2014), en condiciones aeróbicas (tampoco se indican resultados en condiciones anaeróbicas), predominan los cultivos mixtos coincidiendo con nuestros resultados.

2.4. Discusión del recuento de microorganismos en hembras

En el estudio realizado por Bjurström y Linde-Forsberg (1992) afirman que el número promedio de especies bacterianas aisladas en condiciones aeróbicas tiene un valor entre 1,9 y 2,3 por muestra. En el estudio realizado por Janowsky *et al.*, (2008) el valor promedio es de 2,1 especies bacterianas por muestra. En los resultados obtenidos en nuestro estudio, el número promedio de las especies aisladas por muestra vaginal en condiciones aeróbicas ha sido de 3,95 en el caso de las hembras. Es probable que nuestros resultados se deban al hecho de haber utilizado una mayor variedad de medios de cultivos, así como condiciones de incubación más variadas para conseguir un mayor número y diversidad de aislamientos microbianos en comparación a los dos estudios anteriores.

En nuestro estudio, el número promedio de aislamientos por muestra en condiciones anaeróbicas es de 2,8 en hembras. En cuanto a la bibliografía encontrada no se hace referencia al promedio de especies aisladas en muestras vaginales en condiciones anaeróbicas, por lo que probablemente nuestro estudio sea el primero en exponerlo. Se debe recordar que las bacterias anaeróbicas estrictas no sobreviven durante largos períodos en contacto con el oxígeno. Para el aislamiento de este tipo de bacterias, las muestras deben procesarse evitando cualquier contacto con el aire e insertarlos en tubos apropiados que contengan gas sin oxígeno o una solución salina diluida con agente reductor (Poli *et al.*, 1996). En nuestro estudio, el hisopo se insertó inmediatamente en el tubo con medio de transporte semisólido después del muestreo. Sin embargo, es probable que algunas bacterias anaeróbicas estrictas se hayan podido perder durante la etapa de recolección de muestras. La investigación adicional en esta dirección podría aclarar la presencia y el papel de las bacterias anaeróbicas en el tracto genital del perro.

En el estudio estadístico realizado para comparar los porcentajes obtenidos de microorganismos aeróbicos entre las hembras de los diferentes grupos se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las hembras del N1 y las hembras CSCR. Esto puede ser debido a que el porcentaje de microorganismos aislados dentro de las hembras CSCR correspondió a un 43,7%, mientras que en el N1 correspondió al 16,7% de los aislamientos.

En el porcentaje de microorganismos anaeróbicos facultativos se observaron diferencias significativas entre las hembras CSCR y las hembras del N3. Puede ser debido a que el porcentaje de microorganismos anaeróbicos facultativos dentro del N3 fue superior al de hembras CSCR con un 73,7% de los aislamientos frente a un 54,4% respectivamente.

En el caso de los microorganismos anaeróbicos estrictos se observaron diferencias significativas entre las hembras del N1 y el resto de los grupos. Puede ser debido a que el porcentaje de microorganismos anaeróbicos estrictos dentro de las hembras del N1 correspondió a un 16,7% de los aislamientos totales, mientras que para las HC y hembras CSCR correspondió

un 3,6% y 1,9% respectivamente y un 0% tanto para las hembras del N2 como las del N3.

En el estudio de Bjurström y Linde-Forsberg (1992), el número de aislamientos bacterianos en perros varía de 0 a 5. En nuestro estudio, el número de especies bacterianas aisladas para cada muestra vaginal varía de 1 a 8 en condiciones aeróbicas y de 0 a 7 en condiciones anaeróbicas con el predominio de los cultivos mixtos compuestos por dos o más especies bacterianas en ambas condiciones de incubación.

En el estudio realizado por Laurusevicius *et al.* (2008), los microorganismos más frecuentes aislados de muestras vaginales son *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp., *Pasteurella* spp y *Pseudomonas aeruginosa*.

Otros estudios como los realizados por Olson y Mather (1978), Allen y Dagnall (1982) y Baba *et al.* (1983) comentan que a partir de muestras vaginales de perras sanas se pueden aislar con frecuencia microorganismos tales como *Escherichia coli*, *Streptococcus canis*, *Pasteurella multocida*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pseudintermedius* y *Streptococcus* spp. β -hemolíticos. Nuestros resultados coinciden en gran medida con los resultados de los estudios anteriores ya que hemos conseguido aislar de las muestras vaginales todos los microorganismos nombrados a excepción de *Pasteurella* spp.

Según el estudio realizado por Bjurström y Linde-Forsberg (1992), en muestras vaginales las especies bacterianas aisladas con más frecuencia en cultivo axénico en condiciones aeróbicas son: *Pasteurella multocida* y estreptococos β -hemolíticos. En cultivos mixtos se pueden encontrar con frecuencia cultivos formados por estreptococos y *Pasteurella multocida* y estreptococos con *Escherichia coli* (Bjurström y Linde-Forsberg, 1992). A diferencia del anterior estudio, en nuestros resultados obtuvimos cinco cultivos axénicos: cuatro de ellos identificados como *Escherichia coli* y el restante como una especie del género *Bacillus*. La combinación microbiana en cultivo mixto más frecuente en las hembras de nuestro estudio ha sido el formado por *Lactococcus* spp. y *Staphylococcus pseudintermedius* (32% de los cultivos mixtos en las hembras del estudio) por lo que no coinciden con el resultado de Bjurström y Linde-

Forsberg (1992). Sin embargo, sí que hemos conseguido aislar la combinación de *Streptococcus* spp. β -hemolíticos y *Escherichia coli* pero en una frecuencia relativamente baja en comparación a las demás (un 16% de los cultivos mixtos en hembras).

Referente a los cultivos axénicos y mixtos obtenidos en muestras vaginales en condiciones anaeróbicas no se encuentra información en trabajos anteriores. En las muestras vaginales de nuestro estudio obtuvimos en condiciones anaeróbicas 11 cultivos axénicos. Tres identificados como especies del género *Streptococcus* β -hemolíticos, 3 como especies del género *Lactococcus*, 2 como *Escherichia coli*, 2 como especies del género *Streptococcus* no hemolíticos y 1 como especie del género *Bacillus*.

2.5. Discusión del recuento de microorganismos en machos

En los resultados obtenidos en nuestro estudio, el número promedio de las especies aisladas por muestra prepucial en condiciones aeróbicas ha sido de 3 especies. Al igual que ha sucedido en las muestras vaginales, en machos hemos obtenido un resultado superior a los obtenidos en los estudios de Bjurström y Linde-Forsberg (1992) y Janowsky *et al.*, (2008).

En condiciones anaeróbicas, el número promedio de aislamientos por muestra prepucial es de 2,1 especies. Una vez más, no se encuentra bibliografía que indique el número promedio de especies aisladas en muestras prepuciales en condiciones anaeróbicas, por lo que nuestro estudio probablemente sea el primero en exponerlo.

En las muestras prepuciales de nuestro estudio, el número de especies bacterianas aisladas para cada muestra varía de 1 a 6 en condiciones aeróbicas y de 1 a 4 en condiciones anaeróbicas también con el predominio de los cultivos mixtos compuestos por dos más especies bacterianas en ambas

condiciones de incubación. Nuestros resultados vuelven a tener valores superiores en comparación al trabajo de Bjurström y Linde-Forsberg (1992).

Ling y Ruby (1978) estudiaron la microbiota prepucial aislada con más frecuencia en perros sanos. Los microorganismos que se aíslan con más frecuencia son: *Staphylococcus aureus* (60,0% de los perros) y *Mycoplasma* spp. (35,0% de los perros), seguidos de *Escherichia coli* y otras especies pertenecientes a los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas* y *Bacillus*.

Saritas *et al.* (2012) realizaron un estudio similar en machos sanos y observan que los microorganismos más comunes son *Staphylococcus* spp. (36,0% de las bacterias aisladas), seguidos por *Escherichia coli* (30,0%), *Proteus* spp. (16,0%), *Pseudomonas* spp. (6,0%), *Bacillus* spp. (4,0%) y *Corynebacterium* spp. (2,0%).

En un último estudio, realizado por Siugzdaite *et al.* (2019) consiguen aislar de muestras prepuciales de perros sanos microorganismos tales como *Staphylococcus pseudintermedius*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma* spp., *Ureaplasma* spp., *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp. y *Streptococcus* spp.

Nuestros resultados coinciden con algunos de los aislamientos de los estudios anteriores. La bacteria aislada con más frecuencia en las muestras prepuciales de nuestra investigación es *Escherichia coli* (16,4% de los aislamientos totales en machos), seguida de *Streptococcus* spp. β -hemolíticos (12,5%), *Streptococcus* spp. no hemolíticos (11,7%), *S. pseudintermedius* (10,15%) y *Lactococcus* spp. (9,4%).

A diferencia de los estudios realizados por Ling y Ruby (1978), Saritas *et al.* (2012) y Siugzdaite *et al.* (2019), no hemos podido aislar en muestras prepuciales bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Ureaplasma* ni *Mycoplasma*.

Bjurström y Linde-Forsberg (1992) observaron que en condiciones aeróbicas las bacterias más frecuentes aisladas en cultivo axénico procedentes de la mucosa prepucial son: *Pasteurella multocida*, *Staphylococcus pseudintermedius* y *Streptococcus* spp. Por el contrario, *Escherichia coli* no se aísla en cultivos axénicos, pero sí en cultivo mixto junto a *P. multocida* o *Streptococcus* spp. La combinación más común en cultivos mixtos es la formada por estreptococos con *P. multocida*. En nuestro estudio, a partir de las placas cultivadas en condiciones aeróbicas, obtuvimos tres cultivos axénicos, dos de ellos identificados como *Escherichia coli* y el restante como una especie del género *Bacillus*, resultados que difieren de lo publicado previamente. En cuanto a la combinación microbiana más frecuente obtenida en muestras prepuciales en condiciones aeróbicas ha sido la formada por *Streptococcus* spp. β -hemolíticos y *Escherichia coli* por lo que nuestro resultado coincide con el obtenido por Bjurström y Linde-Forsberg (1992).

Referente a los cultivos axénicos y mixtos obtenidos en muestras prepuciales en condiciones anaeróbicas tampoco se encuentra información en trabajos anteriores. En las muestras prepuciales se han obtenido otros 11 cultivos axénicos. Cuatro se han identificado como *Escherichia coli*, 3 como especies del género *Streptococcus* no hemolíticos, una especie del género *Streptococcus* β -hemolíticos y otras tres pertenecientes a los géneros *Proteus*, *Bacteroides* y *Lactococcus*.

Tanto en muestras vaginales como prepuciales, se observa que el aislamiento de una sola especie microbiana no necesariamente indica la presencia de infección como afirman los estudios realizados por van Duijkren (1992), Bjurström (1993) y Root Kustritz (2006). Estos resultados coinciden con lo observado en el presente estudio. Independientemente de la presencia o ausencia de patología, así como del sexo, hubo presencia de cultivos axénicos. Cabe destacar que la mayoría de cultivos axénicos se observaron en condiciones de anaerobiosis. Este es un dato interesante si tenemos presente la creencia generalizada de que, ante una patología genital, si el cultivo es puro, éste es el microorganismo responsable de la infección. Mirando los presentes resultados en un poco de profundidad podría entenderse el por qué

de esta creencia. Si se comparan los porcentajes de cultivos puros agrupando las hembras en sanas y con patología reproductiva, sin tener en cuenta el estatus hormonal, se puede observar que los animales con patología presentan un porcentaje de crecimiento en condiciones de aerobiosis que dobla el porcentaje que presentan los animales sanos. Separando los distintos grupos, podemos observar que la mayoría de ellos carecen de crecimientos axénicos en condiciones de aerobiosis. Sin embargo, esto no es así en condiciones de anaerobiosis. Casi todos los grupos presentan crecimientos axénicos en mayor o menor porcentaje, a excepción del N3.

Como se ha comentado anteriormente, el crecimiento en anaerobiosis necesita unas condiciones muy específicas, por lo que los resultados anteriores pueden no representar la realidad en su totalidad. Por otro lado, en el presente estudio se ha utilizado una amplia variedad de medios de cultivo para obtener el máximo número de microorganismos.

Todos los machos incluidos estaban libres de patología genital, así como todas las hembras con excepción de aquéllas pertenecientes al grupo CSCR. A pesar de su bajo número, un porcentaje de animales sanos presentó cultivos axénicos. Por lo tanto, los resultados sugieren que la presencia de un cultivo puro no tiene porqué estar relacionado.

Las bacterias aisladas en muestras vaginales como en muestras prepuciales forman parte de la microbiota genital normal y se encuentran tanto en perros sanos como en perros con patologías del aparato reproductor, aunque en diferentes porcentajes. Por tanto, los cultivos obtenidos de muestras prepuciales deben ser evaluados de forma exhaustiva y se aconseja administrar un tratamiento solo en presencia de signos clínicos y en función de los resultados obtenidos por pruebas de sensibilidad (Root Kustritz, 2001).

Como se ha comentado con anterioridad, las referencias bibliográficas relativas a la microbiota anaeróbica de la vagina y el prepucio son escasas. En perras sanas, *Peptostreptococcus* spp. *Bacteroides* spp. y *Lactobacillus* spp. son los microorganismos aislados más frecuentes (Baba *et al.*, 1983). *Bacteroides* spp. se consigue aislar durante el estro en el estudio de Watts *et al.* (1996). La gran mayoría de las bacterias que hemos aislado en condiciones anaeróbicas tienen un tipo de respiración anaeróbica facultativa. Las únicas cepas anaeróbicas estrictas aisladas en nuestro estudio pertenecen al género *Bacteroides* y *Bifidobacterium*.

3. Discusión del estudio descriptivo de la microbiota genital en los Núcleos Zoológicos

3.1. Discusión de los recuentos microbianos

A partir de los aislamientos de los tres Núcleos Zoológicos hemos observado que *Escherichia coli* es el microorganismo predominante seguido de *Streptococcus* spp. no hemolíticos, *Streptococcus* spp. β -hemolíticos, *Lactococcus* spp., *Bacillus* spp., *Staphylococcus pseudintermedius* y *Proteus* spp. Las identificaciones bacterianas coinciden en gran parte con los aislamientos obtenidos en estudios como los realizados por Olson (1978), Van Duijkeren (1992), Laznicka (1995) y Laurusevicius *et al.* (2008).

3.2. Discusión de microorganismos según el tipo de respiración

En cuanto a los cultivos axénicos y mixtos obtenidos en los núcleos cabe destacar que de 6 cultivos axénicos aislados en condiciones aeróbicas, 4 se han identificado como *E. coli* y los otros dos restantes como especies del género *Bacillus*. De 14 cultivos axénicos obtenidos en condiciones anaeróbicas, 5 se han identificado como *E. coli*, 3 como especies del género *Streptococcus* no hemolíticos, 2 como especies del género *Streptococcus* β -hemolíticos, 2 *Lactococcus* spp., 1 como especie del género *Bacillus* y el último como una especie del género *Proteus*.

Cabe recordar que los perros procedentes de los tres Núcleos Zoológicos son animales sanos lo que sugiere que el hecho de aislar con frecuencia bacterias como *E. coli* o *Streptococcus* spp. β -hemolíticos no tiene que ir asociado a enfermedad. Como se indica en el trabajo de Root Kustritz (2006) las infecciones del tracto reproductivo están causadas por microorganismos de la microbiota natural. Por ejemplo, en los cultivos de muestras vaginales de perras con vaginitis se aíslan las mismas bacterias que en muestras procedentes de perras sanas. Laurusevicius *et al.* (2008), al igual que en nuestro estudio, aísla en perras sanas microorganismos potencialmente patógenos como especies del género *Staphylococcus* (57,6% de las muestras), *Escherichia coli* (15,1%) o especies del género *Streptococcus* (9,1%). Por último, otro estudio con nuestros mismos resultados es el realizado por Hutchins *et al.* (2014) en el que aísla microorganismos tales como *Escherichia coli* (en 11 de 44 muestras) y *Staphylococcus pseudintermedius* (en 13 de 44 muestras) tanto en muestras de perros sanos como en perros con enfermedades del tracto genitourinario.

En los anteriores artículos nombrados se le da importancia únicamente al crecimiento de las bacterias con potencial patógeno en cultivo. Un resultado cualitativo, basado en la presencia en cultivo de un microorganismo resulta ser un enfoque erróneo, pues en este estudio, al igual que en el trabajo de Root Kustritz (2006), observamos que las bacterias con potencial patógeno forman parte de la microbiota natural de la mucosa vaginal o del prepucio. Los resultados sugieren por lo tanto que, clínicamente, a la hora de relacionar un microorganismo con una enfermedad sería conveniente enfocarse en resultados cuantitativos, como por ejemplo unidades formadoras de colonias (UFC/mL).

3.3. Discusión de los aislamientos microbianos entre los diferentes Núcleos Zoológicos

Janowsky *et al.* (2008) realizaron un estudio sobre la microbiota vaginal de perros alojados en tres refugios diferentes y los resultados muestran que la microbiota tiene una composición diferente entre los grupos de perras. Por ejemplo, *Pasteurella multocida* y *Streptococcus canis* se aíslan en un solo grupo de los tres, mientras que *Staphylococcus pseudintermedius* se aísla en un porcentaje variable entre los tres grupos de perros (12,5%, 20,1% y 40,0%) y *Proteus vulgaris* en dos de los tres refugios.

En los resultados de nuestro estudio indican que las bacterias aisladas con más frecuencia en los animales del N1 son *Escherichia coli*, *Lactococcus* spp., *Proteus* spp., *Streptococcus* spp. β -hemolíticos y *Streptococcus* spp. no hemolíticos. En el caso de N2 los microorganismos más frecuentes son *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp. no hemolíticos, *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp. β -hemolíticos y *Bacillus* spp. Por último, en el N3 el microorganismo predominante fue *Escherichia coli* seguido de *Streptococcus* spp. β -hemolíticos, *Streptococcus* spp. no hemolíticos, *Bacillus* spp., *Proteus* spp., y *Staphylococcus pseudintermedius*. Si únicamente nos fijamos en los resultados de las especies aisladas con más frecuencia podríamos llegar a la conclusión que la composición de la microbiota genital en los tres núcleos es prácticamente la misma. Ahora bien, fijándonos en la totalidad de especies aisladas en cada uno de los núcleos (GRÁFICO de BARRAS N°??), observamos que hay especies microbianas que no se han conseguido aislar en todos los núcleos. Por ejemplo *Bacteroides ovatus*, *Bifidobacterium* spp., *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Mannheimia haemolytica*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus capitis* y *Staphylococcus epidermidis* son microorganismos que sólo se han conseguido aislar en el N1. Del mismo modo sucede con *Acinetobacter* spp., aislado únicamente en el N2. Si miramos entre grupos también podemos observar como *Bacteroides* spp. se aísla en el N1 y N2 o

como *Kocuria rhizophila*, *Kocuria varians* y *Salmonella* spp. sólo se aíslan en el N2 y N3. Por tanto, al igual que en el estudio de Janowsky *et al.* (2008), en nuestro estudio existen pequeñas diferencias en la composición de la microbiota genital entre los perros de los tres Núcleos Zoológicos muestreados. Bjurström y Linde-Forsberg (1992) también detectan variaciones en la frecuencia de aislamiento de bacterias vaginales más frecuentes entre diferentes perreras. Al igual que sucede en el trabajo citado, en nuestros resultados también detectamos variaciones en la frecuencia de aislamiento entre los Núcleos Zoológicos. Por ejemplo, *E. coli* se ha aislado en el 11,3% de las muestras del N1, en el 22,23% de las muestras de N2 y en un 18,7% de las muestras de N3.

Los resultados del estudio estadístico realizado para comparar los porcentajes de aislamientos de cada especie microbiana obtenidos indicó que existen diferencias significativas en el aislamiento de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus plantarum* entre el N1 y los dos núcleos restantes. Esto puede ser debido a no haber obtenido crecimiento de estas bacterias ni en el N2 ni en el N3 frente a los 3 aislamientos de cada microorganismo en el N1. Además también se observan diferencias significativas en el aislamiento de *Proteus* spp. entre el N2 y los dos núcleos restantes. Esto puede ser debido a que el aislamiento de *Proteus* spp. dentro del N1 corresponde a un 9,4% de los aislamientos y en el N3 al 8%, mientras que no consiguieron obtener aislamientos de *Proteus* spp. en el N2.

3.4. Discusión de los aislamientos obtenidos en hembras y machos del mismo entorno

Los resultados obtenidos en nuestra investigación confirman que dentro de un mismo Núcleo Zoológico existen diferencias en la composición de la microbiota genital entre machos y hembras. Si bien pueden existir similitudes entre las especies microbianas aisladas con más frecuencia entre ambos géneros como son *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp. β -hemolíticos, *Streptococcus* spp. no hemolíticos y *Lactococcus* spp., eso no sucede con las bacterias aisladas en menor frecuencia.

Entre los perros del N1 observamos que hay microorganismos como por ejemplo *Bacteroides ovatus*, *Bifidobacterium* spp., *Leuconostoc* spp., *Mannheimia haemolytica* o *Staphylococcus aureus* que sólo se han aislado en hembras. Del mismo modo sucede con *Staphylococcus pseudintermedius*, *Lactobacillus acidophilus*, *Salmonella enterica* o *Enterococcus faecalis* sólo aislados en los machos del N1.

En el caso de los animales del N2 vemos como *Acinetobacter* spp. o *Kocuria rhizophila* solo se han aislado en hembras mientras que *Bacteroides* spp. sólo se ha conseguido aislar en machos.

Por último, en el caso de los perros del N3 observamos como *Lactobacillus* spp. o *Salmonella* spp. sólo los aislamos en muestras vaginales mientras que microorganismos como *Bacillus subtilis*, *Kocuria rhizophila* o *Staphylococcus aureus* sólo se consiguen aislar en las muestras prepuciales.

Por lo tanto, podemos concluir que existen pequeñas diferencias en la composición de la microbiota genital entre machos y hembras del mismo entorno.

3.5. Discusión de los aislamientos obtenidos entre hembras y machos de entornos diferentes

Si observamos los aislamientos entre las hembras de los diferentes Núcleos Zoológicos vemos como en las hembras del N1 se han aislado microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Bacteroides* spp., *Bacteroides ovatus*, *Bifidobacterium* spp., *Mannheimia haemolytica*, *Lactobacillus plantarum* y *Leuconostoc* spp. que no se han conseguido aislar en los otros núcleos. Sucede lo mismo en las hembras del N2 que se aíslan bacterias como *Kocuria rhizophila* y *Acinetobacter* spp. que no se aíslan en el resto de hembras de otros núcleos. Por último, en el caso del N3 se aíslan *Salmonella* spp. y *Staphylococcus* spp. que no se identifican en el resto de hembras de los otros Núcleos Zoológicos.

En los machos también encontramos diferencias en los aislamientos microbianos entre los diferentes Núcleos Zoológicos. En los machos del N1 se identifican especies como *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis* y *Salmonella enterica* spp. *arizonae* que no se han podido identificar en los otros grupos. En el N2 se ha aislado *Salmonella* spp., que no se ha aislado en los otros dos núcleos. Por el último, en los machos del N3 se han aislado especies como *Kocuria rhizophila*, *Staphylococcus* spp. y *Staphylococcus aureus* que no se han podido aislar en los machos de los otros Núcleos Zoológicos.

Otro punto a destacar son las diferencias significativas observadas en la identificación de *Proteus* spp. entre las hembras del N2 y N3 y entre los machos del N1 y N2. Esto puede ser debido a que el aislamiento de esta bacteria dentro de las hembras del N3 correspondió a un 10,5% de los aislamientos totales mientras que en las hembras del N2 no se obtuvieron aislamientos. En cuanto a los machos puede ser debido a que el aislamiento de

Proteus spp. dentro del N1 correspondió a un 11,4% de los aislamientos totales, mientras que en el N2 no se obtuvieron aislamientos.

En nuestro estudio se pensó inicialmente en comparar los resultados obtenidos a partir de las muestras recogidas en los diferentes Núcleos Zoológicos, incluso resaltar un posible “efecto ambiental” sobre el número de bacterias y la composición de la microbiota vaginal y prepucial. Sin embargo, esto no ha sido posible, principalmente, debido al tamaño relativamente pequeño de las muestras de los tres subgrupos (N1, N2 y N3). El muestreo no está equilibrado con respecto a la variable “núcleo zoológico” porque, como ya se ha especificado, el subgrupo N1 cuenta con 10 muestras, N2 con 23 y S3 con 17. Además, los tres subgrupos no tienen el mismo número de machos ni de hembras.

4. Discusión de los aislamientos en los Grupos del Hospital Clínico Veterinario

En cuanto a los grupos del Hospital Clínico Veterinario, se separaron en tres grupos diferentes: las muestras vaginales procedentes de animales Con Signos Clínicos Reproductivos (CSCR) las muestras vaginales procedentes de Hembras en Celo (HC) y las muestras vaginales de hembras que asistieron al hospital para Otros Controles Reproductivos (OCR). Esta agrupación nos ayuda a comparar la microbiota en hembras con diferentes estados de patología y observar si la interferencia hormonal del ciclo sexual afecta o no en la composición de la microbiota vaginal.

En el estudio estadístico realizado para comparar los porcentajes de aislamientos de cada especie microbiana obtenidos en los grupos del Hospital Clínico Veterinario se observan diferencias significativas ($P < 0,05$) en los aislamientos de *Bacteroides* spp., *Enterococcus* spp., *Kocuria* spp., *Lactobacillus* spp. y *Proteus* spp.

En el aislamiento de *Bacteroides* spp. se observan diferencias significativas entre el grupo de MHCV y las hembras para OCR. Esto puede ser debido a que el porcentaje de aislamientos de *Bacteroides* spp. dentro del grupo de MHCV corresponde a un 8,3% mientras que en el grupo de hembras para OCR no se han conseguido aislamientos de esta especie bacteriana.

Las diferencias significativas en el aislamiento de *Enterococcus* spp. se observaron entre los MHCV y las hembras CSCR y HC. Esto puede ser debido a la diferencia de aislamientos, ya que los aislamientos obtenidos en las hembras CSCR y HC corresponden al 0% y 0,4%, respectivamente, frente al 4,2% de los aislamientos obtenidos en los MHCV.

En el aislamiento de *Kocuria* spp. se observan diferencias significativas entre los MHCV y el resto de grupos de hembras. Esto puede ser debido a que el aislamiento de *Kocuria* spp. dentro del grupo de MHCV corresponde a un 8.3% de los aislamientos totales mientras que en el resto de grupos no se consigue aislar, salvo en el grupo de hembras para OCR pero en un porcentaje significativamente bajo (1%).

En los porcentajes de aislamientos de *Lactobacillus* spp. se observan diferencias significativas entre las hembras CSCR y las hembras para OCR. Puede ser debido también al elevado porcentaje de aislamientos en las hembras para OCR (17%) frente al obtenido en las hembras CSCR (5,8%).

El último caso en el que observamos diferencias significativas es en el aislamiento de *Proteus* spp. entre las hembras CSCR y HC y entre las HC y MHCV. Del mismo modo que en los casos anteriores, la razón puede ser debida a la ausencia de crecimiento de estas bacterias en el grupo de HC.

4.1. Discusión de los aislamientos obtenido en Hembras en Celo (HC)

Las muestras vaginales procedentes del grupo de HC se encontraban en las fases de proestro y estro del ciclo sexual. Según los resultados obtenidos por Noguchi *et al.*, (2003), el número de microorganismos de la microbiota vaginal en perras durante el estro es significativamente superior en comparación a las fases de diestro o anestro ($p < 0,0001$). Además también se observan diferencias en la diversidad microbiana entre las distintas fases del ciclo estral. Maksimovic *et al.* (2012) comentan en su revisión bibliográfica que las bacterias aisladas con más frecuencia de la vagina de perras sanas durante el ciclo reproductivo son: *Staphylococcus* spp. (22,0% de los aislamientos), *Streptococcus* spp. (30,5%), *E. coli* (17,0%), *Proteus* spp. (10,0%), *Corynebacterium* spp. (6,8%), *Pasteurella* spp. (5,0%), *Staphylococcus*

pseudintermedius (3,4%), *Staphylococcus aureus* (1,7%), *Enterococcus* spp. (1,7%) y *Neisseria* spp. (1,7%).

En un estudio sobre perras reproductoras sanas en diferentes estados del ciclo estral, se aíslan con mayor frecuencia *Staphylococcus* spp. (57,6% de las perras) y *Staphylococcus aureus* (32,6% de las muestras), seguidos de *E. coli* (15,1%), *Pasteurella* spp. (15,1%), *Streptococcus* spp. (9,1%) y *Pseudomonas aeruginosa* (3,1%) (Laurusevicius *et al.*, 2008). Según Laurusevicius *et al.* (2008), durante el estro, en comparación con otras fases del ciclo estral de la perra, se aísla un número mayor de bacterias. Se ha determinado que en todas las fase del ciclo estral se aísla *Escherichia coli* y *Streptococcus* spp. excepto durante el periodo de gestación. Durante el estro también se puede aislar *Streptococcus* β -hemolíticos y también se ha confirmado el crecimiento de diferentes bacterias que pueden crecer en cualquier fase del ciclo estral (Laurusevicius *et al.*, 2008). En este mismo estudio, las especies más comunes durante el estro son *Staphylococcus aureus* (66,6%) y *Pasteurella multocida* (33,4%).

Nuestros resultados no coinciden con los obtenidos por Laurusevicius *et al.* (2008) ni con los comentados en la revisión de Maksimovic *et al.*, (2012), ya que la bacteria aislada que obtenemos con más frecuencia es *Staphylococcus pseudintermedius* seguida de *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp. β -hemolíticos, *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp. y *Escherichia coli*. En cuanto a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* sí ha sido posible identificarlos pero en baja frecuencia. A diferencia de sus resultados, nosotros no hemos identificado *Pasteurella multocida* en ninguna de las muestras.

En el estudio de Noguchi *et al.* (2003) se evaluaron 9 perras de la raza Beagle. En este estudio se demuestra que los aislamientos totales de microorganismos aeróbicos son comparables con el total de anaeróbicos durante el estro. Las bacterias que se aíslan con más frecuencia (100%) pertenecen a la familia *Bacteroidaceae*, seguido de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, bacilos Gram negativos, estreptococos, lactobacilos y cocos Gram positivos anaerobios. En cuanto a nuestros resultados solo hemos aislado un miembro de la familia *Bacteroidaceae*, *Bacteroides* spp., pero no en el 100% de las

muestras, tan solo en el 3,6% del grupo de HC. Cabe destacar que se han aislado bacterias Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas putida* que si bien han sido aisladas en baja frecuencia son especies posiblemente patógenas relacionadas con enfermedades tales como piometra.

En otro estudio, realizado por Janowsky *et al.*, (2008) se observa que en las perras sanas la microbiota vaginal está compuesta por estreptococos (35,2% de las muestras formadas por estreptococos α -hemolíticos y el 18,7% de estreptococos β -hemolíticos), *Staphylococcus pseudintermedius* (27,5%) y *Lactobacillus* spp. (22,0%). En el caso de los resultados de nuestro estudio, en cuanto a HC, hemos podido aislar cada una de las especies mencionadas por este estudio.

4.2. Discusión de los aislamientos de bacterias ácido lácticas en las Hembras en Celo

Es importante mencionar que en el grupo de HC se han aislado bacterias ácido lácticas con relativa frecuencia tales como *Lactobacillus* spp. (10,1% de las muestras de HC) y *Lactococcus* spp. (12,1%). Identificar bacterias del ácido láctico con frecuencia a partir de muestras vaginales puede ser indicativo de buena salud. En estudios como el realizado por (Fredricks *et al.*, 2005) se comenta que en mujeres con algún tipo de patología genitourinaria como vaginosis bacteriana se producen cambios en la mucosa vaginal como un incremento del pH que reducen las proporciones de *Lactobacillus* spp., aumentando por otra parte la proporción de microorganismos anaeróbicos tales como *Mobiluncus* spp., *Atopobium* spp., *Gardnerella* spp., *Prevotella* spp. o *Clostridium* spp.

En comparación con las otras hembras de los demás grupos de nuestro estudio, en el grupo de HC hemos aislado un número mayor de *Lactobacillus* spp., y *Lactococcus* spp. Este hecho nos puede estar indicando que los cambios producidos en la vagina en la fase de estro puede favorecer la proliferación de las bacterias ácido lácticas. Durante la fase de proestro y estro se produce una proliferación de las células epiteliales de la vagina que comienza a disminuir terminado el estro en adelante (Concannon, 2011). En mujeres, se observa que las bacterias ácido lácticas fermentan la glucosa producida por las células del epitelio a partir del glucógeno para producir ácido láctico. El ácido láctico tiene un efecto antagónico frente a microorganismos patógenos produciendo unas condiciones favorables para el crecimiento de las BAL (Martin *et al.*, 2008). Este podría ser el motivo por el cual podemos aislar un número mayor de *Lactobacillus* spp. y *Lactococcus* spp. en comparación con las hembras del grupo CSCR o las hembras de los Núcleos Zoológicos.

4.2.1. Discusión sobre los aislamientos obtenidos en hembras castradas y hembras enteras

Si comparamos los aislamientos obtenidos en las hembras enteras (Hembras en Celo) con los aislamientos obtenidos en las hembras castradas (Núcleos Zoológicos) observamos coincidencias en las especies microbianas más abundantes pero no en su frecuencia de aislamiento. En el caso de las hembras castradas el microorganismo aislado con más frecuencia es *Escherichia coli* con un total de 21 aislamientos, seguido de *Streptococcus* spp. no hemolíticos con 16 aislamientos, *Streptococcus* spp. β-hemolíticos con 14 aislamientos, *Lactococcus* spp. con 12 aislamientos, *Bacillus* spp. con 11 aislamientos y *Staphylococcus pseudintermedius* con un total de 6 aislamientos. Sin embargo, el microorganismo más abundante en las HC es *Staphylococcus pseudintermedius* con un total de 42 aislamientos, seguido de *Lactococcus* spp. con 30 aislamientos, *Streptococcus* spp. β-hemolíticos con 27

aislamientos, *Lactobacillus* spp. con 25 aislamientos, *Bacillus* spp. con 20 aislamientos, *Streptococcus* spp. no hemolíticos con 20 aislamientos y *Escherichia coli* con un total de 19 aislamientos. Como observamos, el microorganismo más abundante en los Núcleos Zoológicos, *E. coli*, es el séptimo microorganismo más frecuente en las HC. Del mismo modo observamos como el microorganismo más abundante en las HC, *S. pseudintermedius*, es el sexto microorganismo más frecuente en los Núcleos Zoológicos.

En los microorganismos aislados con mejor frecuencia observamos algunas diferencias en la composición microbiana entre hembras castradas y no castradas. Por ejemplo, microorganismos como *Bacteroides ovatus*, *Bifidobacterium* spp., *Kocuria varians*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc* spp., *Mannheimia haemolytica*, *Proteus* spp., se han podido aislar solamente en las muestras vaginales procedentes de los Núcleos Zoológicos. Sin embargo, microorganismos tales como *Enterococcus* spp., *Enterococcus faecalis*, *Flavobacterium* spp., *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* y *Salmonella enterica* solo se han aislado en las muestras vaginales de las HC. Por tanto, observamos que existen diferencias en la composición de la microbiota vaginal entre las hembras castradas y hembras enteras. Además, si nos fijamos en la frecuencia de aislamiento observamos como en las HC los aislamientos de bacterias ácido lácticas tales como *Lactobacillus* spp. y *Lactococcus* spp. son mucho más numerosas que la suma total de los aislamientos de dichas bacterias en los tres Núcleos Zoológicos. El número de aislamientos para *Lactobacillus* spp. en las HC corresponde a 25 aislamientos mientras que en los Núcleos Zoológicos se aíslan 6. Del mismo modo sucede con *Lactococcus* spp., en las HC conseguimos aislar 30 microorganismos mientras que en los Núcleos Zoológicos tan solo 12. Una vez más queda reflejado el posible efecto hormonal sobre el crecimiento de las bacterias ácido lácticas en la mucosa vaginal.

4.3. Discusión de los aislamientos obtenidos en las hembras para Otros Controles Reproductivos.

En el grupo de hembras para OCR se concentra una serie de perras en distinta fase del ciclo sexual pero que no han podido ser agrupadas por falta de pruebas para afirmar con exactitud en la fase en la que se encontraban.

En este grupo la bacteria aislada con más frecuencia ha sido *Staphylococcus pseudintermedius* seguida de *Streptococcus* spp., lo que coincide con los resultados obtenidos por Hashimoto *et al.* (2002), Laurusevicius *et al.* (2008) y Maksimovic *et al.*, (2012).

Al comparar los aislamientos obtenidos en el grupo de hembras para OCR con los aislamientos de las hembras de los Núcleos Zoológicos observamos algunas coincidencias en los microorganismos más abundantes pero no en los porcentajes de aislamientos. Como se ha comentado en el apartado anterior, a diferencia de los aislamientos más frecuentes en las hembras de los Núcleos Zoológicos, el microorganismo más frecuente en las hembras para OCR ha sido *Staphylococcus pseudintermedius* con un total de 9 aislamientos, seguido de *Lactococcus* spp. con 8 aislamientos, *Lactobacillus* spp. con otros 8 aislamientos, *Escherichia coli* con 6 aislamientos y *Streptococcus* spp. β -hemolíticos con un total de 4 aislamientos. Del mismo modo que sucede en las HC, el microorganismo más abundante en las hembras para OCR, *S. pseudintermedius*, es el sexto microorganismo más frecuente en las hembras de los Núcleos Zoológicos.

En cuanto a la composición microbiana, y al igual que en las HC, también existen algunas diferencias. Microorganismos como *Acinetobacter* spp., *Bacillus subtilis*, *Bacteroides* spp., *Bacteroides ovatus*, *Bifidobacterium* spp., *Kocuria varians*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc* spp., *Mannheimia haemolytica*, *Proteus* spp., *Salmonella* spp. y *Staphylococcus* spp. solamente se han podido aislar en las hembras de los Núcleos Zoológicos y no

en las hembras para OCR. Sin embargo, especies como *Flavobacterium* spp., *Proteus mirabilis* y *Pseudomonas putida* solamente se han aislado en las hembras para OCR y no en las hembras de los Núcleos Zoológicos. Por tanto, podemos observar que entre las hembras de estos dos entornos existen diferencias en la composición microbiana. Esto sugiere un posible efecto hormonal en la composición de la microbiota vaginal en la perra.

4.4. Discusión de los aislamientos obtenidos en las hembras Con Signos Clínicos Reproductivos

A partir de las muestras vaginales procedentes de perras con patología en el tracto genitourinario se han identificado como microorganismo predominante *Staphylococcus pseudintermedius* seguido de *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp. β -hemolíticos, *Bacillus* spp. y *Proteus mirabilis*. A excepción de *Lactococcus* spp., todas las especies bacterianas obtenidas con mayor frecuencia en el grupo de hembras CSCR coinciden con las bacterias que se mencionan en los trabajos realizados por Hirsh y Wiger (1977), Olson y Mather (1978) y Hashimoto *et al.* (2002).

En el estudio estadístico realizado para comparar los porcentajes de aislamientos de cada especie microbiana obtenidos en los diferentes grupos de hembras Con Signos Clínicos Reproductivos se observan diferencias significativas ($P < 0,05$) en los aislamientos de *Bacillus subtilis*, *Klebsiella* spp., *Kocuria* spp. y *Salmonella* spp. entre los grupos de hembras con Vaginitis y Piometra. La razón puede ser debida a la ausencia de crecimiento de estas bacterias en las hembras con vaginitis frente a un 5,3% de los aislamientos de cada bacteria en el grupo de hembras con piometra.

4.4.1. Discusión de los aislamientos obtenidos en casos de vaginitis

La vaginitis bacteriana normalmente es secundaria a desordenes hormonales, deficiencias nutricionales, uso de antibióticos o por condiciones higiénicas deficientes que predisponen al animal a un incremento de la proliferación bacteriana (Hashimoto *et al.*, 2002). Normalmente está causada por enterobacterias o por la microbiota del sistema genitorinario inferior como *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus* spp., *Escherichia coli*, *Pasteurella haemolytica* (Sant'Anna, M.C., *et al.*, 2012), *Streptococcus canis*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Streptococcus* β -hemolíticos o *Pasteurella multocida* (Kustritz, 2006).

En el estudio de Hashimoto *et al.* (2002) identifican como bacterias causantes de vaginitis a *Staphylococcus* coagulasa positiva (en un 27,28%), *Proteus* spp. (18,18%), *Streptococcus* spp. (18,18%), *Staphylococcus* coagulasa negativa (9,09%), *Escherichia coli* (9,09%) y *Staphylococcus* coagulasa positiva asociados en cultivo mixto con *Streptococcus* spp. (18,18%).

En nuestro estudio, se obtuvieron 74 aislamientos a partir de las muestras procedentes de hembras con vaginitis. La bacteria que se aísla con más frecuencia es *Staphylococcus pseudintermedius* lo que coincide con los resultados obtenidos en el estudio de Hashimoto *et al.* (2002) y el de Kustritz, (2006). Asimismo, y coincidiendo con el estudio de Hashimoto *et al.* (2002) también aislamos especies como *Proteus mirabilis* y *Escherichia coli*. A lo largo de nuestra investigación, se consiguen aislar una diversidad mayor de especies como *Lactococcus* spp., *Bacillus* spp. y en menor frecuencia especies como *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus* spp., *Kocuria rhizophila* seguidos de *Proteus* spp. y *Pseudomonas aeruginosa*. Este hecho puede ser debido a la siembra de las muestras en una diversa variedad de medios de cultivos y condiciones de incubación.

4.4.2. Discusión de los aislamientos obtenidos en los casos de piometra

La piometra es un trastorno infeccioso e inflamatorio del útero que se produce típicamente en perras enteras durante o inmediatamente después de la fase lútea del ciclo estral (Dennis y Hamm, 2012). Los síntomas comunes son poliuria y polidipsia, anorexia, depresión, vómitos, flujo vaginal y abdomen distendido. Una teoría etiológica común es que las causas primarias son de naturaleza hormonal y que la invasión de bacterias en el útero es un evento secundario. Sin embargo, se cree que la presencia de bacterias y sus toxinas en el útero así como la respuesta inmune del huésped, pueden afectar a varios órganos (Fransson *et al.*, 1997).

La especie bacteriana aislada con más frecuencia en los casos de piometra es *Escherichia coli* (Wheaton *et al.*, 1989; Hagman y Kühn, 2002; Hagman, 2018) en la que según los estudios la frecuencia de aislamiento puede variar entre 59% y 85%. Sin embargo, otras especies, tanto Gram positivas como Gram negativas también están asociadas a casos de piometra en perras (Fransson *et al.*, 1997). Otras especies aisladas en cultivos de piometra canina son: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Proteus* sp., *Pasteurella* sp., *Klebsiella* sp. y *Haemophilus* sp. (Silva-Molano y Loaiza-Echeverri, 2007).

En el estudio realizado por Wheaton *et al.* (1989), a partir de muestras de hembras con piometra aíslan bacterias del género *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Haemophilus*, *Pasteurella*, y *Serratia*.

En el estudio realizado por Fransson *et al.* (1997) se diagnosticaron 48 perras con piometra. De estas perras la bacteria que se aísla con más frecuencia es *Escherichia coli* en un 90% de las muestras. También, pero en menor medida, se aísla *Pasteurella multocida* y *Streptococcus canis* (ambas especies en el 2% de las muestras). En el estudio de Ros *et al.* (2014) a partir de 11 muestras de perras con piometra aíslan con mayor frecuencia *Escherichia coli* (en 6 de las muestras), *Staphylococcus pseudintermedius* (en 2 muestras), estreptococos β -hemolíticos (2 muestras), *Pseudomonas aeruginosa* (1 muestras) y *Escherichia fergusonii* (1 muestra).

En las identificaciones que hemos obtenido en nuestro estudio observamos coincidencias con los trabajos citados anteriormente. En nuestras muestras de hembras con piometra también identificamos microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., beta hemolíticos, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Proteus* spp. y *Klebsiella* spp. No hemos identificado géneros bacterianos como *Pasteurella*, *Enterococcus*, *Haemophilus*, *Pseudomonas* o *Serratia* que si se aíslan en los trabajos anteriores. Sin embargo, a diferencia de los anteriores trabajos hemos aislado en casos de piometra otros microorganismos como *Salmonella* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Acinetobacter* spp., *Bacillus* spp., *Bacillus subtilis* y *Kocuria* spp.,

Hay que tener en cuenta que en el presente estudio, los cultivos eran de vagina y no de útero, por lo tanto no son comparables. Sin embargo, según Watts *et al.* (1996), los microorganismos aislados en el útero son un reflejo de la microbiota vaginal.

4.4.3. Discusión de los aislamientos obtenidos en hembras sanas y enfermas

En el estudio realizado por Golinska *et al.* (2017) se llegó a la conclusión de que se podían llegar a aislar los mismos microorganismos de muestras vaginales procedentes de hembras sanas como de hembras con infecciones en el tracto genital. Los resultados obtenidos en nuestra investigación coinciden con la conclusión de dicho estudio, ya que tanto de animales sanos como de animales con enfermedades del tracto genitourinario podemos confirmar que se pueden aislar las mismas especies microbianas aunque existen diferencias en cuanto a la frecuencia de aislamiento. Esto es así porque los microorganismos potencialmente patógenos aislados en nuestro estudio son bacterias que en su mayoría forman parte de la microbiota vaginal de la perra, como por ejemplo *Escherichia coli* y bacterias del género *Streptococcus* spp. y del género *Staphylococcus* (Ling y Ruby 1978; Bjurström y Linde-Forsberg, 1992; Golinska *et al.*, 2017; Corró *et al.*, 2019).

Según el estudio realizado por Hutchins *et al.* (2014), los cultivos mixtos son comunes tanto en perros sanos como en aquellos con infecciones del tracto genitourinario. En nuestro estudio, los cultivos mixtos en condiciones aeróbicas se han obtenido en el 94% de las muestras y en condiciones anaeróbicas en el 79% de las muestras. Tanto en las muestras procedentes de animales sanos como de animales CSCR hemos obtenido cultivos mixtos pero con ciertas diferencias en cuanto a la combinación microbiana.

En las hembras CSCR la combinación bacteriana más frecuente en cultivo mixto en condiciones aeróbicas está formada por especies del género *Streptococcus* β -hemolíticos y *Staphylococcus pseudintermedius* seguida de especies del género *Proteus* y *S. pseudintermedius*. Otras combinaciones frecuentes aisladas pero en condiciones anaeróbicas han sido *Lactococcus* spp. y *Streptococcus* spp. β -hemolíticos seguida de *Lactococcus* spp. y *S. pseudintermedius*. En hembras sanas, como el grupo HC, en condiciones

aeróbicas la combinación microbiana más frecuente ha sido la formada por *Lactobacillus* spp. y *Staphylococcus pseudintermedius* seguida de *Lactococcus* spp. y *S. pseudintermedius*. Otras combinaciones aisladas pero en condiciones anaeróbicas han sido las formadas por *Lactococcus* spp. y *Streptococcus* β -hemolíticos seguida de *Lactobacillus* spp. y *Streptococcus* spp. β -hemolíticos. Como observamos en condiciones aeróbicas, las dos combinaciones más frecuentes en el grupo de hembras CSCR están formadas por bacterias potencialmente patógenas y en condiciones anaeróbicas la bacteria potencialmente patógena crece junto a una bacteria del ácido láctico. Sin embargo, en el grupo de HC las dos combinaciones más frecuentes en condiciones aeróbicas están formadas por *Staphylococcus pseudintermedius* un microorganismo con potencial patógeno, junto a bacterias del ácido láctico. En el caso de las hembras en celo, las bacterias ácido lácticas podrían estar ejerciendo un efecto antimicrobiano para regular el sobrecrecimiento de microorganismos oportunistas dado que el efecto hormonal favorecería las condiciones ambientales para su crecimiento y no el de microorganismos oportunistas (Fons *et al.*, 2000; Reis *et al.*, 2012; Sánchez, 2015). Sin embargo, en las hembras CSCR tienen una patología de base por lo que la microbiota genital se encuentra alterada. Sin embargo, aislar bacterias del ácido láctico podría ser beneficioso a la hora de administrar probióticos para restaurar el equilibrio de la microbiota y atenuar la infección.

En los cultivos mixtos en las hembras de los Núcleos Zoológicos en condiciones aeróbicas estuvieron formadas principalmente por *Streptococcus* spp. no hemolíticos y *Escherichia coli* seguidos de *Streptococcus* spp. β -hemolíticos y *Escherichia coli*. En este caso tanto en las hembras CSCR como en las hembras de los Núcleos Zoológicos predominan cultivos mixtos formados por microorganismos potencialmente patógenos. En este caso podemos afirmar que el hecho de poder aislar microorganismos considerados patógenos no es indicio de infección y se deberían llevar a cabo más estudios clínicos para confirmar una posible enfermedad.

4.5. Discusión de los aislamientos de *Staphylococcus pseudintermedius*

Es interesante hacer notar el resultado obtenido en el aislamiento de *Staphylococcus pseudintermedius* tanto en el bloque de los Núcleos Zoológicos como en el bloque del Hospital Clínico Veterinario. *S. pseudintermedius* es un microorganismo comensal de piel y mucosas en los caninos, y entre las infecciones más frecuentes se describen las que produce en piel, oído, vías urinarias y hueso (Vigo *et al.*, 2015). Recientemente, ha surgido un *S. pseudintermedius* resistente a la meticilina (SPRM) en pequeños animales de todo el mundo y representa una grave amenaza para la salud del animal debido a su fenotipo de resistencia a múltiples fármacos (Paul *et al.*, 2010).

Los estafilococos más comunes que habitan en la piel y las mucosas humanas son *Staphylococcus aureus* y estafilococos coagulasas negativos. La presencia de *S. pseudintermedius* en humanos se limita principalmente a personas que tienen contacto regular con perros y gatos, como veterinarios y dueños de mascotas (Paul *et al.*, 2010). En el estudio de Paul *et al.* (2010) se ofrecieron voluntarios 128 veterinarios dermatólogos de pequeños animales para investigar la prevalencia de *S. aureus* y *S. pseudintermedius*. El estudio afirma el aislamiento de *S. pseudintermedius* en el 3,9% de los voluntarios. Este dato, a pesar de ser aparentemente bajo, se considera relativamente alto por cuatro razones: a) *S. pseudintermedius* no es un organismo comensal normal del ser humano, sólo se ha detectado una baja prevalencia en la microbiota nasofaríngea de veterinarios; b) el transporte de *S. pseudintermedius* se produce en el personal veterinario por lo que se esperaría incluso tasas más bajas al representar al mismo tiempo una pequeña fracción de la población de la especie; c) la problemática de los *S. pseudintermedius* resistentes a la meticilina (SPRM) ha surgido recientemente, ya que el primer informe en perros en Europa data del 2007; y d) la tasa de SPRM ha sido más alta que para MRSA, que es la especie de estafilococos resistentes a la meticilina asociada tradicionalmente a humanos (Paul *et al.*, 2010).

Teniendo en consideración que SPRM no pertenece a la microbiota natural del humano junto a las infecciones registradas de esta bacteria llegamos a la conclusión, al igual que Paul *et al.* (2010), que *S. pseudintermedius* debe considerarse como un agente zoonótico emergente. Dado los datos obtenidos acerca de la frecuencia de aislamiento de esta bacteria en nuestros animales sería de interés seguir investigando focalizándose en los SPRM.

4.6. Discusión de los aislamientos de *Streptococcus* β -hemolíticos

Otras bacterias a tener en cuenta en nuestro estudio son las especies del género *Streptococcus*. Mediante la clasificación microbiana que hemos realizado en nuestro estudio, microorganismos como *Staphylococcus pseudintermedius*, *Lactococcus* spp. o *Escherichia coli* han sido los microorganismos más frecuentes en los aislamientos totales. Esto no habría sido así si hubiésemos englobado todas las especies del género *Streptococcus* en un solo grupo y no en dos, ya que la suma de especies de estreptococos totales es muy superior a los aislamientos de las bacterias anteriores. Por ejemplo, si en los recuentos totales englobásemos estreptococos β -hemolíticos y no hemolíticos en un solo grupo de especies del género *Streptococcus*, el resultado habría sido de 130 aislamientos pasando por encima de los 86 aislamientos de *S. pseudintermedius*.

En nuestro estudio se ha decidido dividir en dos grupos a las especies del género *Streptococcus* por razones clínicas. Los *Streptococcus* pueden estar clasificados según la capacidad hemolítica que presenten en el medio de cultivo agar sangre: α -hemolíticos, β -hemolíticos y γ hemolíticos (no hemolíticos). Normalmente, las especies de estreptococos α -hemolíticos y γ -hemolíticos no son considerados microorganismos potencialmente patógenos (Lamm *et al.*, 2010), mientras que los estreptococos β -hemolíticos están

relacionadas con infertilidad, enfermedades uterinas y abortos, entre otras (Johnston *et al.*, 2001).

Algunas de las especies de estreptococos están clasificadas mediante los grupos de Lancefield basados en los polisacáridos de la pared celular. Las especies del género *Streptococcus* con capacidad patógena en el perro pertenecen a los grupos de Lancefield B, C, D o G (Lamm *et al.*, 2010). Especialmente, los estreptococos del grupo B están reconocidos como una de las principales causas de mortalidad neonatal en perros sin posibilidad de tratamientos efectivos. A día de hoy, la única solución posible para salvar la vida de los cachorros es mediante la prevención. Otros mecanismos útiles para reducir la contaminación fetal preparto o después del nacimiento del cachorro son mediante el parto asistido obligatorio y la administración de antibióticos en el preparto e intraparto (Meloni *et al.*, 2013).

En nuestro estudio hemos aislado *Streptococcus* spp. β -hemolíticos en el 11,3% de los aislamientos totales. Si miramos por grupos, observamos que han sido frecuentes tanto en animales sanos (Hembras de los Núcleos Zoológicos, Hembras en Celo y hembras para Otros Controles Reproductivos) como en las hembras Con Signos Clínicos Reproductivos (CSCR). Las especies del género *Streptococcus* con capacidad β -hemolítica también forman parte de la microbiota vaginal de la perra por lo que aislar este tipo de bacterias no implica necesariamente que el animal sufra algún tipo de enfermedad genitourinaria o infertilidad (McVey *et al.*, 2013). Sin embargo, de acuerdo con el estudio de Meloni *et al.* (2013), deben tomarse todas las medidas de prevención necesarias siempre y cuando se haya identificado el microorganismo y suponga un peligro potencial para los cachorros. El abuso de fármacos como los antibióticos solo supondría aumentar y transmitir las resistencias horizontalmente de perro a perro (Roja *et al.*, 2011; Groppetti *et al.*, 2012)

5. Viabilidad de la conservación de las cepas aisladas

5.1. Discusión de la viabilidad de los liófilos

Acercas del ensayo de la viabilidad de liófilos de tres bacterias diferentes la bacteria que se mantiene más estable a lo largo del tiempo es *Lactobacillus curvatus*, disminuyendo cerca de un logaritmo en la concentración bacteriana recuperada. Por otro lado, *Escherichia coli* es la bacteria más inestable conservada en liófilo a lo largo del tiempo, descendiendo de una concentración aproximada de 10^8 UFC/mL en el tiempo 0 a 10^4 UFC/mL transcurridos los 90 días. Las diferencias observadas en cuanto a la viabilidad pueden ser debidas a las diferencias en la composición de la pared bacteriana ya que *Lactobacillus curvatus* se trata de un microorganismo Gram positivo cuya pared es mucho más gruesa en comparación a la de un Gram negativo como es *E. coli* pudiendo resistir mejor todo el proceso que conlleva la liofilización.

5.2. Discusión de la viabilidad en crioperlas

En general, utilizando el método de crioconservación obtenemos concentraciones bacterianas estables a lo largo del tiempo en las tres bacterias utilizadas para el ensayo.

Entre las cepas de bacterias evaluadas, *Escherichia coli* es la que se mantiene más estable conservada en crioperlas durante los 90 días de estudio. En cuanto a *Lactobacillus curvatus* y *Staphylococcus aureus* se recuperan concentraciones bacterianas inferiores a las de *E. coli*. Sin embargo, si observamos las concentraciones recuperadas en los primeros tiempos, por ejemplo tiempo 0 o 24 horas, vemos como las tres cepas se han mantenido estables respecto a las concentraciones recuperadas a los 90 días. Es muy

probable que la viabilidad de tres cepas a lo largo de los 90 días sea debida a los componentes crioprotectores que incluyen los crioviales estériles Cryoinstant[®] (Deltalab S.L., España) impidiendo así el daño celular durante el proceso de congelación aumentando la supervivencia de los microorganismos conservados.

5.3. Discusión sobre los métodos de conservación utilizados

Según los datos que hemos obtenido en ambos métodos de conservación, el que nos ha dado mejores resultados, respecto a la concentración bacteriana recuperada a lo largo del tiempo de las tres especies bacterianas, ha sido la crioconservación mediante Crioviales Cryoinstant[®].

Hubálek (2003) menciona una gran cantidad de factores que intervienen en la efectividad de la crioconservación de microorganismos, desde las características propias del individuo (cepa, especie, tamaño, fase de crecimiento al momento de congelar...), así como los factores antes (composición del medio de cultivo, ph, temperatura de incubación), durante y posterior al proceso de crioconservación (densidad poblacional, aditivos, temperatura y duración del almacenamiento...), e incluso en su descongelación.

En el caso de la liofilización, si el proceso es exitoso puede asegurar una viabilidad de los microorganismos por varios años. Sin embargo, el éxito depende de muchos factores, incluidos los nombrados por Hubáke (2003) para la crioconservación. Los factores como el tiempo de liofilización, los parámetros de liofilización, el medio, aditivo o lioprotector utilizado, tipo de liofilizador, accesorio utilizado pueden influir en el producto final (Castañeda Rangel, 2016).

Discusión

Observando los resultados obtenidos en nuestro estudio, creemos que la crioconservación mediante crioviales estériles Cryoinstant[®] (Deltalab S.L., España) es un método de conservación que, a diferencia de la liofilización, nos asegura una mayor viabilidad de las cepas a lo largo del tiempo gracias a los componentes crioconservantes añadidos.

6. Evaluación del potencial probiótico

De las 13 cepas preseleccionadas como posibles probióticos, 9 presentan α -hemólisis o hemólisis parcial y el resto γ -hemólisis o ausencia de hemólisis. Ninguna de las cepas evaluadas presenta β -hemólisis o hemólisis total, por lo que los resultados de este ensayo las hace buenas candidatas para su uso como probióticos.

En el ensayo de sensibilidad a los antibióticos observamos como tan solo 6 cepas muestran sensibilidad a la serie de antibióticos establecidos por la EFSA, por lo que las 7 cepas restantes quedan descartadas del estudio. Las cepas que no muestran resistencias y, por tanto, siguen siendo candidatas como probióticas son: *Lactobacillus curvatus* 1, *Lactococcus lactis* 1, *Lactobacillus plantarum* 1, *Lactobacillus plantarum* 2, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *delbrueckii* y *Lactobacillus plantarum* 3. Además, según los resultados de resistencia a las condiciones gastrointestinales todas resultaron ser resistentes a las sales biliares, a la lisozima, al peróxido de hidrógeno y a las condiciones de pH ácido.

En cuanto a los resultados de la actividad antimicrobiana observamos que *Lactococcus lactis* en la primera modificación de la técnica de Kirby Bauer parece no tener actividad antimicrobiana frente a *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Proteus* spp. ni a *Bacillus cereus*. También por la misma técnica, *Lactobacillus plantarum* 1 y *Lactobacillus plantarum* 2 no son capaces de inhibir el crecimiento de *Salmonella typhimurium*. Sin embargo, utilizando la segunda modificación de la técnica de Kirby Bauer observamos como las tres bacterias muestran actividad antimicrobiana frente a las 12 bacterias utilizadas en el ensayo.

Estas diferencias entre técnicas pueden ser debido a diferentes factores. En primer lugar, la cantidad de cepa láctica que se deposita en el disco no es la misma en los dos métodos. En la segunda modificación se deposita en el agar

Mueller Hinton un disco de agar con crecimiento de cepa láctica, lo que podría favorecer la difusión de sustancias antimicrobianas producidas por las BAL y en una mayor concentración que en los discos de la primera modificación del método de Kirby Bauer. En segundo lugar, hemos observado durante los ensayos que las BAL utilizadas tenían un crecimiento muy lento en las placas de Mueller Hinton lo que producía crecimiento de bacterias contaminantes. Este hecho también podría influir en los resultados obtenidos en la primera modificación del método de Kirby Bauer dado que las bacterias patógenas podrían tener un crecimiento más óptimo en Mueller Hinton que las BAL impidiendo su crecimiento y, por tanto, la difusión de la concentración necesaria de sustancias antimicrobianas. Por ello, observando los resultados obtenidos, podemos decir que las cepas lácticas que presentan más actividad antimicrobiana frente a la diversidad de microorganismos patógenos seleccionados son *Lactobacillus plantarum* 1 y *Lactobacillus plantarum* 2.

Según la bibliografía las especies del género *Lactobacillus* se utilizan con frecuencia como probióticos. En mujeres los lactobacilos son los microorganismos dominantes en la microbiota vaginal y son de suma importancia como barrera frente a infecciones dada su alta capacidad de adherencia en el epitelio vaginal y a la producción de sustancias antimicrobianas como pueden ser el peróxido de hidrógeno, ácido láctico y/o bacteriocinas (Brown 2012; Borges *et al.*, 2014).

En el ámbito canino no existen grandes avances en probióticos destinados a prevenir enfermedades del sistema genitourinario. Sin embargo sí existen varios estudios como los realizados por O' Mahoney *et al.* (2009) o Gange *et al.* (2013), entre otros, que utilizan probióticos destinados a prevenir enfermedades del sistema gastrointestinal. Por tanto, dado el resultado de nuestro estudio podría ser interesante la administración de estas dos cepas de *Lactobacillus plantarum* en aquellas hembras con signos clínicos reproductivos para observar si se consigue disminuir las recidivas y estudiar si existen reducciones o no de microorganismos con potencial patógeno en las muestras vaginales.

Conclusiones

Conclusiones

1. El microorganismo aislado con más frecuencia en las muestras de nuestro estudio ha sido *Staphylococcus pseudintermedius*.
2. Los microorganismos aislados con más frecuencia en cada uno de los grupos han sido: *Escherichia coli* en los tres Núcleos Zoológicos y *Staphylococcus pseudintermedius* en las hembras Con Signos Clínicos Reproductivos, Hembras en Celo, hembras para Otros Controles Reproductivos y en los Machos del Hospital Clínico Veterinario.
3. Ni la mucosa vaginal ni la mucosa prepucial de perros son ambientes estériles. Se han podido aislar microorganismos en el 100% de las muestras procesadas.
4. Mediante técnicas de microbiología clásica el número de especies microbianas diferentes aisladas en condiciones aeróbicas se sitúa en un rango de entre 1 a 7 especies, mientras que en condiciones anaeróbicas se sitúa en un rango de entre 0 a 5 especies diferentes.
5. Los cultivos mixtos predominan muy por encima de los cultivos axénicos.
6. La obtención de cultivos axénicos no indica necesariamente un proceso de infección en el animal.
7. Existen similitudes en cuanto a las bacterias aisladas con más frecuencia entre animales de diferentes entornos. Sin embargo, existen diferencias entre la diversidad microbiana obtenida en cada grupo y entre machos y hembras del entorno.

8. Es posible aislar la misma diversidad microbiana a partir de muestras procedentes de hembras con signos clínicos reproductivos como de muestras procedentes de hembras sanas. Lo que indica que aislar microorganismos con potencial patógeno no es indicativo de una infección en el animal.

9. En el grupo de Hembras en Celo el aislamiento de bacterias del ácido láctico como *Lactobacillus* spp. y *Lactococcus* spp. es mayor a la del resto de hembras.

10. La crioconservación mediante Crioviales Cryosant[®] mantienen la viabilidad de las cepas más tiempo que la conservación mediante liofilización.

11. De las 13 cepas de bacterias ácido lácticas aisladas a partir de las muestras prepuciales y vestibulo vaginales evaluadas como posibles probióticos solo fueron seguras y resistentes *in vitro* a las condiciones gastrointestinales las nombradas como *Lactobacillus curvatus* 1, *Lactococcus lactis* 1, *Lactobacillus plantarum* 1, *Lactobacillus plantarum* 2, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *delbrueckii* y *Lactobacillus plantarum* 3.

12. Las bacterias ácido lácticas tienen una función relevante en el equilibrio de la microbiota genital mediante el mantenimiento de un pH ácido y la producción de metabolitos, lo que en su conjunto favorece la eliminación de microorganismos potencialmente patógenos. De la evaluación de la actividad antimicrobiana de las 6 bacterias ácido lácticas seleccionadas, las nombradas como *Lactobacillus plantarum* 1 y *Lactobacillus plantarum* 2 son las que mostraron mayor actividad antimicrobiana frente a la diversidad de microorganismos potencialmente patógenos seleccionados.

Anexos

ANEXO I

Género	Núcleo zoológico	Microorganismos	
		Condiciones aeróbicas	Condiciones anaeróbicas
Hembra	N1	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	<i>Bacteroides ovatus</i>
		<i>E. coli</i>	<i>Bifidobacterium</i> spp.
Hembra	N1	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico
		<i>Mannheimia hemolytica</i>	<i>Lactococcus</i> spp.
		<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	
Hembra	N1	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Lactococcus</i> spp.
		<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Bacteroides</i> spp.
		<i>E. coli</i>	<i>Proteus</i> spp.
		<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítico
			<i>Leuconostos</i> spp.
Macho	N1	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico
		<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Lactococcus</i> spp.
		<i>Lactococcus lactis</i>	
Macho	N1	<i>E. coli</i>	<i>Bacteroides</i> spp.
		<i>Lactococcus acidophilus</i>	<i>Lactococcus</i> spp.
		<i>Bacillus subtilis</i>	
Macho	N1	<i>E. coli</i>	<i>Bacillus</i> spp.
		<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	<i>Proteus</i> spp.
		<i>Lactococcus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.
		<i>Staphylococcus capitis</i>	
Macho	N1	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico
		<i>Staphylococcus capitis</i>	<i>Bacillus</i> spp.
		<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítico	
		<i>Lactococcus acidophilus</i>	
Macho	N1	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítico	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico
		<i>E. coli</i>	<i>Proteus</i> spp.
Macho	N1	<i>E. coli</i>	<i>Proteus</i> spp.
		<i>Proteus</i> spp.	
Macho	N1	<i>Salmonella enterica</i> spp. <i>arizonae</i>	<i>Proteus</i> spp.
		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.
		<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítico	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítico
			<i>Lactococcus</i> spp.

Anexos

Género	Núcleo zoológico	Microorganismos	
		Condiciones aerobias	Condiciones anaerobias
Hembra	N2	<i>E. coli</i>	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítico
		<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítico	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico
			<i>E. coli</i>
Hembra	N2	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico
		<i>E. coli</i>	
		<i>Kocuria rhizophila</i>	
Hembra	N2	<i>E. coli</i>	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítico
			<i>Lactococcus</i> spp.
Hembra	N2	<i>Kocuria rhizophila</i>	
		<i>S. pseudintermedius</i>	
Hembra	N2	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítico	<i>E. coli</i>
		<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico	<i>Bacillus</i> spp.
		<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítico
		<i>Bacillus</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp.
Hembra	N2	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítico	<i>Lactococcus</i> spp.
		<i>Acinetobacter</i> spp.	
		<i>E. coli</i>	
Hembra	N2	<i>Bacillus</i> spp.	
Hembra	N2	<i>E. coli</i>	<i>Bacillus</i> spp.
		<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítico	<i>Lactobacillus</i> spp.
		<i>Lactococcus</i> spp.	
		<i>Lactobacillus</i> spp.	
Hembra	N2	<i>E. coli</i>	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítico
		<i>S. pseudintermedius</i>	<i>E. coli</i>
		<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítico	
		<i>Bacillus subtilis</i>	
Hembra	N2	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
		<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítica	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítico
		<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico
Hembra	N2	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
		<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico
		<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus</i> spp.
		<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactococcus</i> spp.
		<i>Lactococcus</i> spp.	

Anexos

Género	Núcleo zoológico	Microorganismos	
		Condiciones aerobias	Condiciones anaerobias
Hembra	N2	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
		<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítico
		<i>Lactococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico
		<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus</i> spp.
		<i>Bacillus</i> spp.	<i>Lactococcus</i> spp.
Hembra	N2	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
			<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítico
			<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico
			<i>Lactococcus</i> spp.
Hembra	N2	<i>Kocuria varians</i>	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítico
		<i>Kocuria rhizophila</i>	<i>E. coli</i>
		<i>E. coli</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.
		<i>Lactococcus</i> spp.	
Macho	N2	<i>E. coli</i>	<i>Lactococcus</i> spp.
		<i>Kocuria varians</i>	<i>E. coli</i>
		<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítico	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítico
			<i>Bacillus</i> spp.
Macho	N2	<i>E. coli</i>	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítico
		<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico	
Macho	N2	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
			<i>Bacillus</i> spp.
			<i>Lactococcus</i> spp.
Macho	N2	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Lactococcus</i> spp.
Macho	N2	<i>E. coli</i>	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico
		<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítico	<i>Bacteroides</i> spp.
		<i>Lactococcus</i> spp.	<i>E. coli</i>
		<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Lactococcus</i> spp.
		<i>Salmonella</i> spp.	
Macho	N2	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítico
		<i>E. coli</i>	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico
			<i>E. coli</i>
			<i>Lactobacillus</i> spp.
			<i>Lactococcus</i> spp.

Anexos

Género	Núcleo zoológico	Microorganismos	
		Condiciones aerobias	Condiciones anaerobias
Macho	N2	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
		<i>S. pseudintermedius</i>	
Macho	N2	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico	<i>E. coli</i>
		<i>E. coli</i>	
		<i>S. pseudintermedius</i>	
Macho	N2	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
Hembra	N3	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico
		<i>Lactococcus</i> spp.	<i>Lactococcus</i> spp.
		<i>Bacillus</i> spp.	
Hembra	N3	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítico	<i>E. coli</i>
		<i>E. coli</i>	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico
		<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Proteus</i> spp.
		<i>Lactococcus</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.
Hembra	N3	<i>E. coli</i>	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítico
		<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítico	<i>E. coli</i>
		<i>Bacillus</i> spp.	<i>Proteus</i> spp.
Hembra	N3	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico	<i>Bacillus</i> spp.
		<i>E. coli</i>	
Hembra	N3	<i>E. coli</i>	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico
		<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítico	<i>Lactobacillus</i> spp.
		<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico	<i>Lactococcus</i> spp.
		<i>Kocuria varians</i>	
		<i>S. pseudintermedius</i>	
		<i>Salmonella</i> spp.	
		<i>Lactobacillus</i> spp.	
		<i>Lactococcus</i> spp.	
Hembra	N3	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítico
		<i>E. coli</i>	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico
		<i>Bacillus</i> spp.	
Hembra	N3	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>E. coli</i>
		<i>Proteus</i> spp.	

Anexos

Género	Núcleo zoológico	Microorganismos	
		Condiciones aerobias	Condiciones anaerobias
Hembra	N3	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítico
		<i>E. coli</i>	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico
		<i>Bacillus</i> spp.	
		<i>Proteus</i> spp.	
		<i>S. pseudintermedius</i>	
Macho	N3	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítico
		<i>E. coli</i>	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico
		<i>S. aureus</i>	<i>Bacillus</i> spp.
Macho	N3	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico	<i>E. coli</i>
		<i>Kocuria varians</i>	
		<i>E. coli</i>	
Macho	N3	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico
		<i>E. coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
		<i>Proteus</i> spp.	
		<i>Kocuria rhizophila</i>	
		<i>Bacillus subtilis</i>	
		<i>S. pseudintermedius</i>	
Macho	N3	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítico	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítico
		<i>S. pseudintermedius</i>	
Macho	N3	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico
		<i>E. coli</i>	<i>Lactococcus</i> spp.
		<i>Proteus</i> spp.	
		<i>Lactococcus</i> spp.	
Macho	N3	<i>Lactococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico
		<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítico	
		<i>S. pseudintermedius</i>	
Macho	N3	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítico	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítico
		<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolíticos	
		<i>E. coli</i>	
		<i>Bacillus subtilis</i>	
Macho	N3	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítico	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico
		<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico	<i>E. coli</i>
		<i>E. coli</i>	
		<i>Staphylococcus</i> spp.	
Macho	N3	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
		<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítico
		<i>Kocuria varians</i>	
		<i>Bacillus subtilis</i>	

Anexos

Con Signos Clínicos Reproductivos (CSCR)					
Muestra ID	Raza	Edad	Patología	Microorganismos	
				Condiciones aeróbicas	Condiciones anaeróbicas
1	Beagle	3 años	Vaginitis	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítico	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolíticos
				<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Lactococcus</i> spp.
				<i>Kocuria rhizophila</i>	
2	Mestiza	6 años	Vaginitis	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico
				<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Lactococcus</i> spp.
				<i>Kocuria rhizophila</i>	
				<i>Flavobacterium</i> spp.	
3	American Bully Staffords hire	5 años	Vaginitis	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
				<i>Bacillus</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.
4	Mestiza	-	Vaginitis	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico	<i>Lactococcus</i> spp.
				<i>S. pseudintermedius</i>	
				<i>Bacillus</i> spp.	
				<i>Acinetobacter</i> spp.	
5	Mestiza	-	Vaginitis	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítico	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico
				<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
				<i>Lactococcus</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp.
					<i>Lactococcus</i> spp.
6	Pitbull	9 años	Vaginitis	<i>S. pseudintermedius</i>	
				<i>Proteus mirabilis</i>	
				<i>Bacillus</i> spp.	
7	American Bully	3 años	Vaginitis	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico
				<i>S. aureus</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
				<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
				<i>Lactococcus</i> spp.	<i>Lactococcus</i> spp.
8	American Bully	3 años	Vaginitis	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
				<i>S. aureus</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
				<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.
				<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactococcus</i> spp.
				<i>Lactococcus</i> spp.	
9	American Bully	2 años	Vaginitis	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
				<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Lactococcus</i> spp.
				<i>Proteus mirabilis</i>	
				<i>Lactobacillus</i> spp.	
				<i>Lactococcus</i> spp.	

Anexos

Con Signos Clínicos Reproductivos (CSCR)					
Muestra ID	Raza	Edad	Patología	Microorganismos	
				Condiciones aeróbicas	Condiciones anaeróbicas
10	Mestiza	-	Vaginitis	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico
				<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
				<i>Lactococcus</i> spp.	<i>Lactococcus</i> spp.
11	Pointer	5 años	Vaginitis	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolíticos	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolíticos
				<i>Kocuria rhizophila</i>	<i>Kocuria rhizophila</i>
				<i>Proteus mirabilis</i>	
12	American Bully	Joven	Vaginitis	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
				<i>Streptococcus</i> spp. no hemolíticos	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolíticos
				<i>Lactococcus</i> spp.	<i>Lactococcus</i> spp.
				<i>Proteus</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp.
				<i>Bacillus</i> spp.	<i>Proteus</i> spp.
		<i>Bacillus</i> spp.			
13	Bulldog frances	11 años	Vaginitis	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
14	Exotic Bully	2 años	Vaginitis	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico
				<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
				<i>S. aureus</i>	
				<i>Proteus mirabilis</i>	
15	Mestiza	-	vaginitis	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
				<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
				<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
				<i>Acinetobacter</i> spp.	
				<i>Kocuria rhizophila</i>	
				<i>Bacillus</i> spp.	
16	Pastor Alemán	Vieja	Vaginitis	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
					<i>Streptococcus</i> spp. no hemolíticos
17	Weimara ner	-	Vaginitis	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolíticos	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolíticos
				<i>Bacillus</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.
				<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Bacteroides</i> spp.
					<i>Flavobacterium</i> spp.
		<i>Lactococcus</i> spp.			

Anexos

Con Signos Clínicos Reproductivos (CSCR)					
Muestra ID	Raza	Edad	Patología	Microorganismos	
				Condiciones aeróbicas	Condiciones anaeróbicas
18	American Bully	2 años	Vaginitis	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico
				<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
				<i>S. pseudintermedius</i>	
				<i>Bacillus</i> spp.	
19	Mastina	-	Vulvitis	<i>Flavobacterium</i> spp.	<i>Lactococcus</i> spp.
				<i>S. pseudintermedius</i>	
				<i>Bacillus</i> spp.	
				<i>Lactococcus</i> spp.	
20	Akita Inu	5 años	Vulvitis	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico
				<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
				<i>Lactococcus</i> spp.	<i>Lactococcus</i> spp.
				<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>Bacteroides</i> spp.
21	American Bully	3 años	Piometra	<i>E. coli</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
				<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico	<i>Lactococcus</i> spp.
				<i>S. pseudintermedius</i>	
				<i>S. aureus</i>	
				<i>Lactobacillus</i> spp.	
				<i>Salmonella</i> spp.	
22	Pastor Alemán	Vieja	Piometra	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico
				<i>Kocuria</i> spp.	<i>Proteus</i> spp.
				<i>Bacillus subtilis</i>	
				<i>Bacillus</i> spp.	
				<i>Acinetobacter</i> spp.	
				<i>Klebsiella</i> spp.	
				<i>Lactococcus</i> spp.	
				<i>Lactobacillus</i> spp.	
23	Boxer	2 años	Masa uterina	<i>E. coli</i>	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico
				<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico	
				<i>S. pseudintermedius</i>	

Anexos

Hembras en Celo (HC)					
Muestra ID	Raza	Edad	Microorganismos		
			Condiciones aeróbicas	Condiciones anaeróbicas	
57	American Bully	4 años	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	
			<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico	<i>Lactococcus</i> spp.	
			<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.	
			<i>Proteus mirabilis</i>		
58	American Bully	2 años	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico	
			<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	
			<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactococcus</i> spp.	
			<i>Bacillus</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp.	
59	Pinxer mini	8 años	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítico	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolíticos	
			<i>S. pseudintermedius</i>		
			<i>Flavobacterium</i> spp.		
60	Golden Retriever	5 años	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico	
			<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>Acinetobacter</i> spp.	
61	Rottweiler	5 años	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	
			<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>Lactococcus</i> spp.	
			<i>Bacillus</i> spp.	<i>Bacteroides</i> spp.	
62	Bull Terrier	7 años	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico	
			<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	
			<i>Lactococcus</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp.	
			<i>Bacillus</i> spp.	<i>Lactococcus</i> spp.	
				<i>Bacteroides</i> spp.	
63	Puddle toy	2 años	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolíticos	
			<i>S. aureus</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	
			<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp.	
				<i>Bacteroides</i> spp.	
64	Rottweiler	5 años	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	
			<i>Kocuria rhizophila</i>	<i>Acinetobacter</i> spp.	
			<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.	
			<i>Bacillus</i> spp.		
65	Pastor Belga	6 años	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolíticos	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolíticos	
			<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	
			<i>Kocuria rhizophila</i>	<i>Kocuria rhizophila</i>	
			<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.	
			<i>Bacillus</i> spp.	<i>Bacteroides</i> spp.	
66	Akita Inu	5 años	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico		
			<i>S. pseudintermedius</i>		
			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		

Anexos

Hembras en Celo (HC)				
Muestra ID	Raza	Edad	Microorganismos	
			Condiciones aeróbicas	Condiciones anaeróbicas
67	American Bully	2 años	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico
			<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
			<i>Lactococcus</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp.
			<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Lactococcus</i> spp.
			<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
68	Exotic Bully	joven	<i>E. coli</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.
			<i>Bacillus</i> spp.	<i>Lactococcus</i> spp.
			<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítica	
			<i>Lactobacillus</i> spp.	
			<i>Lactococcus</i> spp.	
			<i>S. pseudintermedius</i>	
69	American Bully	-	<i>Flavobacterium</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico
			<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.
			<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítica	<i>Lactococcus</i> spp.
			<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Kocuria rhizophila</i>
			<i>Lactococcus</i> spp.	
			<i>Kocuria rhizophila</i>	
70	American Bully	Joven	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
			<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítica
			<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítica	<i>Lactococcus</i> spp.
			<i>Lactococcus</i> spp.	
71	Exotic Bully	Joven	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
			<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.
			<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítica	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítica
			<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico
			<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactococcus</i> spp.
			<i>Lactococcus</i> spp.	

Anexos

Otros Controles Reproductivos (OCR)					
Muestra ID	Raza	Edad	Microorganismos		
			Condiciones aeróbicas	Condiciones anaeróbicas	
72	American Bully	3 años	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico	
			<i>Pseudomonas putida</i>		
			<i>Kocuria rhizophila</i>		
			<i>Lactobacillus</i> spp.		
73	American Bully	3 años	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	
			<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolíticos	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolíticos	
			<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	
			<i>Lactococcus</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp.	
				<i>Lactococcus</i> spp.	
74	American Bully	5 años	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	
			<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolíticos	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolíticos	
			<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.	
			<i>Kocuria rhizophila</i>	<i>Lactococcus</i> spp.	
			<i>Lactobacillus</i> spp.		
			<i>Lactococcus</i> spp.		
75	Setter Gordon	12 años	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	
			<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítico	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolítico	
			<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	
			<i>Lactococcus</i> spp.	<i>Lactococcus</i> spp.	
			<i>Bacillus</i> spp.	<i>Flavobacterium</i> spp.	
76	American Bully	3 años	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	
			<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.	
			<i>Bacillus</i> spp.	<i>Lactococcus</i> spp.	
77	American Bully	3 años	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	
			<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	
			<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	
			<i>Lactococcus</i> spp.	<i>Lactococcus</i> spp.	
			<i>Bacillus</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp.	
78	American Bully	-	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolíticos	<i>S. pseudintermedius</i>	
			<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.	
			<i>Lactococcus</i> spp.	<i>Lactococcus</i> spp.	
			<i>Flavobacterium</i> spp.		

Anexos

Otros Controles Reproductivos (OCR)				
Muestra ID	Raza	Edad	Microorganismos	
			Condiciones aeróbicas	Condiciones anaeróbicas
79	American Bully	3 años	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
			<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Lactococcus</i> spp.
			<i>Kocuria rhizophila</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.
			<i>Lactococcus</i> spp.	
			<i>Lactobacillus</i> spp.	
80	Mestiza		<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.
			<i>E. coli</i>	<i>Lactococcus</i> spp.
			<i>Lactobacillus</i> spp.	
			<i>Lactococcus</i> spp.	

Machos del Hospital Clínico Veterinario (MHCV)				
Muestra ID	Raza	Edad	Microorganismos	
			Condiciones aeróbicas	Condiciones anaeróbicas
81	-	-	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
			<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
82	-	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacteroides</i> spp.
			<i>Bacillus</i> spp.	
83	-	-	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus</i> spp.
			<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	<i>Lactococcus</i> spp.
			<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico
84	-	-	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.
			<i>Streptococcus</i> spp. no hemolíticos	<i>Lactococcus</i> spp.
			<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Enterococcus</i> spp.
			<i>Bacillus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp. β-hemolítico
			<i>Kocuria</i> spp.	
85	-	-	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	<i>Bacteroides</i> spp.
			<i>Bacillus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp. no hemolíticos
			<i>Kocuria</i> spp.	
			<i>Streptococcus</i> spp. no hemolíticos	

ANEXO II

Género	NZ	Microorganismos		
		Aeróbico	Anaeróbico facultativo	Anaeróbico estricto
Hembra	N1		<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	<i>Bacteroides ovatus</i>
			<i>Escherichia coli</i>	<i>Bifidobacterium</i> spp.
Hembra	N1	<i>S. aureus</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	
			<i>Lactococcus</i> spp.	
			<i>Mannheimia hemolytica</i>	
			<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	
Hembra	N1	<i>S. aureus</i>	<i>Lactococcus</i> spp.	<i>Bacteroides</i> spp.
		<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>	
			<i>Proteus</i> spp.	
			<i>Streptococcus</i> spp.	
			<i>Leuconostoc</i> spp.	
			<i>Lactococcus lactis</i>	
Macho	N1	<i>S. aureus</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	
			<i>Lactococcus</i> spp.	
			<i>Enterococcus faecalis</i>	
			<i>Lactococcus lactis</i>	
Macho	N1	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacteroides</i> spp.
			<i>Lactococcus</i> spp.	
			<i>Lactococcus acidophilus</i>	
Macho	N1	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	
		<i>Staphylococcus capitis</i>	<i>Proteus</i> spp.	
			<i>Lactobacillus</i> spp.	
			<i>Escherichia coli</i>	
			<i>Lactococcus acidophilus</i>	
Macho	N1	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	
		<i>Staphylococcus capitis</i>	<i>Lactococcus acidophilus</i>	
		<i>Bacillus</i> spp.		
Macho	N1		<i>Streptococcus</i> spp.	
			<i>Proteus</i> spp.	
			<i>Escherichia coli</i>	
Macho	N1		<i>Proteus</i> spp.	
			<i>Escherichia coli</i>	
Macho	N1	<i>S. epidermidis</i>	<i>Proteus</i> spp.	
			<i>Lactobacillus</i> spp.	
			<i>Streptococcus</i> spp.	
			<i>Lactococcus</i> spp.	
			<i>Salmonella enterica</i> spp <i>arizonae</i>	

Anexos

Género	NZ	Microorganismos		
		Aeróbico	Anaeróbico facultativo	Anaeróbico estricto
Hembra	N2		<i>Streptococcus</i> spp.	
			<i>Escherichia coli</i>	
Hembra	N2	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	
		<i>Kocuria rhizophila</i>	<i>Escherichia coli</i>	
Hembra	N2		<i>Streptococcus</i> spp.	
			<i>Lactococcus</i> spp.	
			<i>Escherichia coli</i>	
Hembra	N2	<i>Kocuria rhizophila</i>		
		<i>S. pseudintermedius</i>		
Hembra	N2	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Escherichia coli</i>	
		<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.	
			<i>Streptococcus</i> spp.	
Hembra	N2	<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>Lactococcus</i> spp.	
			<i>Streptococcus</i> spp.	
			<i>Escherichia coli</i>	
Hembra	N2	<i>Bacillus</i> spp.		
Hembra	N2	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Lactococcus</i> spp.	
			<i>Lactobacillus</i> spp.	
			<i>Escherichia coli</i>	
			<i>Streptococcus</i> spp.	
Hembra	N2	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	
		<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Escherichia coli</i>	
Hembra	N2		<i>Escherichia coli</i>	
			<i>Streptococcus</i> spp.	
Hembra	N2	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Escherichia coli</i>	
		<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	
			<i>Lactobacillus</i> spp.	
			<i>Lactococcus</i> spp.	
Hembra	N2	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>	
		<i>Bacillus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	
		<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Lactococcus</i> spp.	
Hembra	N2		<i>Escherichia coli</i>	
			<i>Streptococcus</i> spp.	
			<i>Lactococcus</i> spp.	

Anexos

Género	Núcleo zoológico	Microorganismos		
		Aeróbico	Anaeróbico facultativo	Anaeróbico estricto
Hembra	N2	<i>Kocuria varians</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	
		<i>Kocuria rhizophila</i>	<i>Escherichia coli</i>	
			<i>Lactobacillus</i> spp.	
			<i>Lactococcus</i> spp.	
Macho	N2	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Lactococcus</i> spp.	
		<i>Kocuria varians</i>	<i>Escherichia coli</i>	
			<i>Streptococcus</i> spp.	
Macho	N2		<i>Streptococcus</i> spp.	
			<i>Escherichia coli</i>	
Macho	N2	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Escherichia coli</i>	
			<i>Lactococcus</i> spp.	
Macho	N2	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Lactococcus</i> spp.	
Macho	N2	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Bacteroides</i> spp.
			<i>Salmonella</i> spp.	
			<i>Escherichia coli</i>	
			<i>Lactococcus</i> spp.	
Macho	N2	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	
			<i>Escherichia coli</i>	
			<i>Lactobacillus</i> spp.	
			<i>Lactococcus</i> spp.	
Macho	N2	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Escherichia coli</i>	
Macho	N2	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Escherichia coli</i>	
			<i>Streptococcus</i> spp.	
Macho	N2		<i>Escherichia coli</i>	
Hembra	N3	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	
			<i>Lactococcus</i> spp.	
Hembra	N3	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Escherichia coli</i>	
			<i>Streptococcus</i> spp.	
			<i>Proteus</i> spp.	
			<i>Lactobacillus</i> spp.	
			<i>Lactococcus</i> spp.	
Hembra	N3	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	
			<i>Escherichia coli</i>	
			<i>Proteus</i> spp.	

Anexos

Género	Núcleo zoológico	Microorganismos		
		Aeróbico	Anaeróbico facultativo	Anaeróbico estricto
Hembra	N3	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	
			<i>Escherichia coli</i>	
Hembra	N3	<i>Kocuria varians</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	
		<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.	
			<i>Lactococcus</i> spp.	
			<i>Escherichia coli</i>	
Hembra	N3		<i>Salmonella</i> spp.	
		<i>Bacillus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	
Hembra	N3		<i>Escherichia coli</i>	
			<i>Proteus</i> spp.	
Hembra	N3	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	
		<i>Bacillus</i> spp.	<i>Escherichia coli</i>	
			<i>Proteus</i> spp.	
Macho	N3	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	
		<i>S. aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	
Macho	N3	<i>Kocuria varians</i>	<i>Escherichia coli</i>	
			<i>Streptococcus</i> spp.	
Macho	N3	<i>Kocuria rhizophila</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	
		<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>	
		<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Proteus</i> spp.	
Macho	N3		<i>Streptococcus</i> spp.	
		<i>S. pseudintermedius</i>		
Macho	N3		<i>Streptococcus</i> spp.	
			<i>Lactococcus</i> spp.	
			<i>Escherichia coli</i>	
			<i>Proteus</i> spp.	
Macho	N3	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	
			<i>Lactococcus</i> spp.	
Macho	N3	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	
			<i>Escherichia coli</i>	
Macho	N3	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	
			<i>Escherichia coli</i>	
Macho	N3	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>	
		<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	
		<i>Kocuria varians</i>		

Anexos

Con Signos Clínicos Reproductivos (CSCR)						
Muestra ID	Raza	Edad (años)	Patología	Microorganismos		
				Aeróbico	Anaeróbico facultativo	Anaeróbico estricto
1	Beagle	3	Vaginitis	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	
				<i>Kocuria rhizophila</i>	<i>Lactococcus</i> spp.	
2	Mestiza	6	Vaginitis	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	
				<i>Kocuria rhizophila</i>	<i>Lactococcus</i> spp.	
				<i>Flavobacterium</i> spp.		
3	American Bully Staffordshire	5	Vaginitis	<i>S. aureus</i>		
				<i>Bacillus</i> spp.		
4	Mestiza	-	Vaginitis	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Lactococcus</i> spp.	
				<i>Bacillus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	
				<i>Acinetobacter</i> spp.		
5	Mestiza	-	Vaginitis	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	
					<i>Lactobacillus</i> spp.	
					<i>Lactococcus</i> spp.	
6	Pitbull	9	Vaginitis	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	
				<i>Bacillus</i> spp.		
7	American Bully	3	Vaginitis	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	
				<i>S. aureus</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	
					<i>Lactococcus</i> spp.	
8	American Bully	3	Vaginitis	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	
				<i>S. aureus</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.	
					<i>Lactococcus</i> spp.	
9	American Bully	2	Vaginitis	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Escherichia coli</i>	
					<i>Lactococcus</i> spp.	
					<i>Proteus mirabilis</i>	
					<i>Lactobacillus</i> spp.	
10	Mestiza	-	Vaginitis		<i>Streptococcus</i> spp.	
					<i>Proteus mirabilis</i>	
					<i>Lactococcus</i> spp.	
11	Pointer	5	Vaginitis	<i>Kocuria rhizophila</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	
					<i>Proteus mirabilis</i>	

Anexos

Con Signos Clínicos Reproductivos (CSCR)						
Muestra ID	Raza	Edad (años)	Patología	Microorganismos		
				Aeróbico	Anaeróbico facultativo	Anaeróbico estricto
12	American Bully	Joven	Vaginitis	Bacillus spp.	E. coli	
					Streptococcus spp.	
					Lactococcus spp.	
					Lactobacillus spp.	
				Proteus spp.		
13	Bulldog frances	11	Vaginitis		E. coli	
14	Exotic Bully	2	Vaginitis	S. pseudintermedius	Streptococcus spp.	
				S. aureus	Proteus mirabilis	
15	Mestiza	-	vaginitis	S. pseudintermedius	Pseudomonas aeruginosa	
				S. aureus		
				Acinetobacter spp.		
				Kocuria rhizophila		
				Bacillus spp.		
16	Pastor Alemán	Vieja	Vaginitis		E. coli	
					Streptococcus spp.	
17	Weimaraner	-	Vaginitis	Flavobacterium spp.	Streptococcus spp.	Bacteroides spp.
				Bacillus spp.	Lactococcus spp.	
				S. pseudintermedius		
18	American Bully	2	Vaginitis	S. pseudintermedius	Streptococcus spp.	
				Bacillus spp.	Proteus mirabilis	
19	Mastina	-	Vulvitis	Flavobacterium spp.	Lactococcus sp.	
				S. pseudintermedius		
				Bacillus spp.		
20	Akita Inu	5	Vulvitis	S. pseudintermedius	Streptococcus spp.	Bacteroides spp.
				Acinetobacter spp.	Lactococcus spp.	
21	American Bully	3	Piometra	S. pseudintermedius	E. coli	
				S. aureus	Lactococcus spp.	
					Streptococcus spp.	
					Lactobacillus spp.	
					Salmonella spp.	
22	Pastor Alemán	Vieja	Piometra	S. aureus	Streptococcus spp.	
				Kocuria spp.	Proteus spp.	
				Bacillus subtilis	Klebsiella spp.	
				Bacillus spp.	Lactococcus spp.	
				Acinetobacter spp.	Lactobacillus spp.	
23	Boxer	2	Masa uterina	S. pseudintermedius	Streptococcus spp.	
					E. coli	

Anexos

Hembras en Celo (HC)					
Muestra ID	Raza	Edad (años)	Microorganismos		
			Aeróbico	Anaeróbico facultativo	Anaeróbico estricto
24	Bull Terrier	7	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>E. coli</i>	
			<i>S. aureus</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	
			<i>Kocuria rhizophila</i>	<i>Lactococcus</i> spp.	
				<i>Lactobacillus</i> spp.	
25	American Bully	5	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	
				<i>Pseudomonas</i> spp.	
				<i>Lactobacillus</i> spp.	
26	Scottish Terrier	9	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.	
			<i>S. aureus</i>	<i>Lactococcus</i> spp.	
27	American Bully	5	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>E. coli</i>	
			<i>Flavobacterium</i> spp.		
			<i>Bacillus</i> spp.		
28	Bull Terrier	8	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	
				<i>Lactococcus</i> spp.	
				<i>Lactobacillus</i> spp.	
29	American Bully	3	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>E. coli</i>	
			<i>Bacillus subtilis.</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	
				<i>Lactobacillus</i> spp.	
				<i>Lactococcus</i> spp.	
				<i>Proteus mirabilis</i>	
30	Rottweiler	5	<i>Bacillus subtilis.</i>		<i>Bacteroides</i> spp.
			<i>S. pseudintermedius</i>		
			<i>Bacillus</i> spp.		
31	Pastor Alemán	3	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	
			<i>Flavobacterium</i> spp.		
			<i>Bacillus</i> spp.		
32	American Bully	3	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	
			<i>Bacillus</i> spp.	<i>Lactococcus</i> spp.	
				<i>Lactobacillus</i> spp.	
33	Bull Terrier	7	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	
				<i>Pseudomonas putida</i>	
				<i>Lactobacillus</i> spp.	
				<i>Lactococcus</i> spp.	
				<i>Enterococcus faecalis</i>	

Anexos

Hembras en Celo (HC)					
Muestra ID	Raza	Edad (años)	Microorganismos		
			Aeróbico	Anaeróbico facultativo	Anaeróbico estricto
34	Rottweiler	4	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> sp.	
				<i>Salmonella enterica</i> spp <i>arizonae</i>	
35	Bulldog Francés	7	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	
			<i>Acinetobacter</i> spp.		
36	Pastor Alemán	7	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	
			<i>Bacillus</i> spp.	<i>Proteus mirabilis</i>	
37	Akita Inu	7	<i>Flavobacterium</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Bacteroides</i> spp.
				<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
38	American Bully	3		<i>E. coli</i>	
				<i>Streptococcus</i> spp.	
				<i>Lactobacillus</i> spp.	
				<i>Lactococcus</i> spp.	
39	American Bully	3	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>E. coli</i>	
			<i>S. aureus</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	
			<i>Bacillus</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp.	
				<i>Proteus mirabilis</i>	
				<i>Lactococcus</i> spp.	
40	Golden Retriever	5	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	
			<i>S. aureus</i>	<i>Lactococcus</i> spp.	
			<i>Bacillus</i> spp.		
			<i>Kocuria rhizophila</i>		
41	Akita Inu	7	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Bacteroides</i> spp.
			<i>Kocuria rhizophila</i>		
42	American Bully	2	<i>Bacillus subtilis.</i>	<i>E. coli</i>	
			<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	
				<i>Lactococcus</i> spp.	
				<i>Lactobacillus</i> spp.	
				<i>Salmonella</i> spp.	
43	American Bully	2	<i>Bacillus</i> spp.	<i>E. coli</i>	
				<i>Streptococcus</i> spp.	
				<i>Lactobacillus</i> spp.	
				<i>Lactococcus</i> spp.	

Anexos

Hembras en Celo (HC)					
Muestra ID	Raza	Edad (años)	Microorganismos		
			Aeróbico	Anaeróbico facultativo	Anaeróbico estricto
44	Americana Bully	2	<i>Bacillus</i> spp.	<i>E. coli</i>	
			<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	
				<i>Proteus mirabilis</i>	
				<i>Lactococcus</i> spp.	
45	Americana Bully	2	<i>Kocuria rhizophila</i>	<i>E. coli</i>	
			<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Lactococcus</i> spp.	
			<i>S. aureus</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.	
46	Exotic Bully	4	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	
			<i>S. aureus</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	
			<i>Bacillus</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp.	
			<i>Kocuria rhizophila</i>		
47	Pointer	5	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.	
			<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	
48	Americana Bully	3	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>E. coli</i>	
				<i>Proteus mirabilis</i>	
				<i>Lactococcus</i> spp.	
49	Americana Bully	2	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	
				<i>Lactococcus</i> spp.	
				<i>Proteus mirabilis</i>	
50	Americana Bully Staffordshire	2	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Bacteroides</i> spp.
			<i>S. aureus</i>	<i>Lactococcus</i> spp.	
			<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp.	
51	Americana Bully	2	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>E. coli</i>	
				<i>Streptococcus</i> spp.	
				<i>Lactococcus</i> spp.	
52	Americana Bully	3	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>E. coli</i>	
			<i>Bacillus</i> spp.	<i>Proteus mirabilis</i>	
				<i>Lactococcus</i> spp.	
				<i>Streptococcus</i> spp.	
53	Americana Bully	3	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>E. coli</i>	
				<i>Streptococcus</i> spp.	
				<i>Lactococcus</i> spp.	
				<i>Proteus mirabilis</i>	

Anexos

Hembras en Celo (HC)					
Muestra ID	Raza	Edad (años)	Microorganismos		
			Aeróbico	Anaeróbico facultativo	Anaeróbico estricto
54	American Bully	3	<i>Bacillus</i> spp.	<i>E. coli</i>	
			<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	
				<i>Lactococcus</i> spp.	
55	American Bully	2	<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	
			<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.	
				<i>Lactococcus</i> spp.	
56	Pointer	7	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Bacteroides</i> spp.
			<i>Kocuria rhizophila</i>		
			<i>Flavobacterium</i> spp.		
57	American Bully	4	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>E. coli</i>	
				<i>Lactococcus</i> spp.	
				<i>Lactobacillus</i> spp.	
				<i>Streptococcus</i> spp.	
58	American Bully	2	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	
			<i>Bacillus</i> spp.	<i>Lactococcus</i> spp.	
				<i>Lactobacillus</i> spp.	
59	Pinxer mini	8	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus</i> sp.	
			<i>Flavobacterium</i> spp.		
60	Golden Retriever	5	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	
			<i>Acinetobacter</i> spp.		
61	Rottweiler	5	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Lactococcus</i> spp.	<i>Bacteroides</i> spp.
			<i>Acinetobacter</i> spp.		
			<i>Bacillus</i> spp.		
62	Bull Terrier	7	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Bacteroides</i> spp.
			<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.	
				<i>Lactococcus</i> spp.	
63	Puddle toy	2	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Bacteroides</i> spp.
			<i>S. aureus</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.	
			<i>Acinetobacter</i> spp.		
64	Rottweiler	5	<i>S. pseudintermedius</i>		
			<i>Kocuria rhizophila</i>		
			<i>Acinetobacter</i> spp.		
			<i>Bacillus</i> spp.		

Anexos

Hembras en Celo (HC)					
Muestra ID	Raza	Edad (años)	Microorganismos		
			Aeróbico	Anaeróbico facultativo	Anaeróbico estricto
65	Pastor Belga	6	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Bacteroides</i> spp.
			<i>Kocuria rhizophila</i>		
			<i>Acinetobacter</i> spp.		
			<i>Bacillus</i> spp.		
66	Akita Inu	5	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	
				<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
67	American Bully	2	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	
				<i>Enterococcus</i> spp.	
				<i>Lactobacillus</i> spp.	
				<i>Lactococcus</i> spp.	
				<i>E. coli</i>	
68	Exotic Bully	joven	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.	
			<i>Bacillus</i> spp.	<i>Lactococcus</i> spp.	
				<i>E. coli</i>	
				<i>Streptococcus</i> spp.	
69	American Bully	-	<i>Flavobacterium</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	
			<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.	
			<i>Kocuria rhizophila</i>	<i>Lactococcus</i> spp.	
70	American Bully	Joven	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>E. coli</i>	
				<i>Streptococcus</i> spp.	
				<i>Lactococcus</i> spp.	
71	Exotic Bully	Joven	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	
				<i>Streptococcus</i> spp.	
				<i>Lactobacillus</i> spp.	
				<i>Lactococcus</i> spp.	

Anexos

Otros Controles Reproductivos (OCR)					
Muestra ID	Raza	Edad (años)	Microorganismos		
			Aeróbico	Anaeróbico facultativo	Anaeróbico estricto
72	American Bully	3	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus</i> sp.	
			<i>Kocuria rhizophila</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	
				<i>Lactobacillus</i> spp.	
73	American Bully	3	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>E. coli</i>	
				<i>Streptococcus</i> spp.	
				<i>Lactobacillus</i> spp.	
74	American Bully	5	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>E. coli</i>	
			<i>Kocuria rhizophila</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	
				<i>Lactobacillus</i> spp.	
75	Setter Gordon	12	<i>Flavobacterium</i> spp.	<i>E. coli</i>	
			<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	
			<i>Bacillus</i> spp.	<i>Lactococcus</i> spp.	
76	American Bully	3	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>E. coli</i>	
			<i>Bacillus</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp.	
				<i>Lactococcus</i> spp.	
77	American Bully	3	<i>Bacillus</i> spp.	<i>E. coli</i>	
			<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Lactococcus</i> spp.	
			<i>S. aureus</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.	
78	American Bully	-	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	
			<i>Flavobacterium</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp.	
				<i>Lactococcus</i> spp.	
79	American Bully	3	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	
			<i>Kocuria rhizophila</i>	<i>Lactococcus</i> spp.	
				<i>Lactobacillus</i> spp.	
80	Mestiza	-	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.	
				<i>Lactococcus</i> spp.	
				<i>E. coli</i>	

Anexos

Machos del Hospital Clínico Veterinario (MHCV)					
Muestra ID	Raza	Edad (años)	Microorganismos		
			Aeróbico	Anaeróbico facultativo	Anaeróbico estricto
81	-	-	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>E. coli</i>	
82	-	-	<i>S. aureus</i>		<i>Bacteroides spp.</i>
			<i>Bacillus spp.</i>		
83	-	-	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Proteus spp.</i>	
				<i>Lactococcus spp.</i>	
				<i>Streptococcus spp.</i>	
				<i>Escherichia coli</i>	
84	-	-	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Lactobacillus spp.</i>	
			<i>Bacillus spp.</i>	<i>Lactococcus spp.</i>	
			<i>Kocuria spp.</i>	<i>Enterococcus spp.</i>	
				<i>Streptococcus spp.</i>	
				<i>Proteus mirabilis</i>	
85	-	-	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Streptococcus spp.</i>	<i>Bacteroides spp.</i>
			<i>Bacillus spp.</i>		
			<i>Kocuria spp.</i>		

Bibliografía

A

Adams, M. (1999). Safety of industrial lactic acid bacteria. *J Biotech*, 68(2), 171-178.

Adlerberth, Marina Cerquetti, Isabelle Poilane, Agnes Wold. y Anne Collignon, I. (2000). Mechanisms of colonisation and colonisation resistance of the digestive tract part 1: bacteria/host interactions. *Microb Ecol Health Dis*, 12(2), 223-239.

Aktas, M. S., Borku, M. K. y Ozkanlar, Y. (2007). Efficacy of *Saccharomyces boulardii* as a probiotic in dogs with lincomycin-induced diarrhea. *Bull Vet Inst Pulawy*, 51, 365-369.

Alarcón Cavero, T., D'Auria, G., Delgado Palacio, S., Del Campo Moreno, R. y Ferrer Martínez, M. (2016). Microbiota. *SEIMC*, 2(59), 1-43.

Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E. y Chevallier, I. (2006). Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food control*, 17(6), 454-461.

Arencibia, D., Rosario, L. y Gámez, R. (2008). *Métodos generales de conservación de microorganismos*. La Habana, Cuba, Liorad Ediciones.

Arribas, B., Rodríguez, M. E., Camuesco, D., Zarzuelo Zurita, A. y Gálvez, J. (2008). Aplicaciones terapéuticas de los probióticos. *Ars Pharm*, 49(1), 5-30.

Aslim, B. y Kilic, E. (2006). Some probiotic properties of vaginal lactobacilli isolated from healthy women. *Jpn J Infect Dis*, 59(4), 249.

B

Basu, S., Catterjee, M., Ganguly, S. y Chandra P. K. (2007). Effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG in persistent diarrhea in Indian Children: a randomized controlled trial. *J Clin Gastroenterol*; 41: 756-760.

Beachey, E. H. (1981). Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J Infect Dis*, 143(3), 325-345.

Belmonte, A., Noguerras, M. G., Contigiani, M. B., Gandini, V. y Sutich, E. G. (2008). Estudio de métodos por congelación para la conservación y mantenimiento de cepas de *Gardnerella vaginalis*. *Bioquímica y Patología Clínica*, 72(2), 15.

Beltrán de Heredia, M. R. (1987). Microbiota autóctona. *Farmacia profesional economía y gestión*. 31(2), 17-21.

Berezovsky, J. (2015). *Changes in the preputial pH values in canines and their relation to age, cytology and the occurrence of preputial discharge* (Doctoral dissertation). Szent István University, Budapest.

Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C. y Gil, A. (2012). Probiotic mechanisms of action. *Ann Nutr Metab*, 61(2), 160-174.

Bjurström, L. y Linde-Forsberg, C. (1992). Long-term study of aerobic bacteria of the genital tract in stud dogs. *Am J Vet Res*, 53(5), 670-673.

Bowles, M. (2013). Probiotic agents. In *Canine and Feline Gastroenterology* (pp. 526-529). WB Saunders.

Brito, E. H., Fontenelle, R. O., Brilhante, R. S., Cordeiro, R. A., Monteiro, A. J., Sidrim, J. J. y Rocha, M. F. (2009). The anatomical distribution and antimicrobial susceptibility of yeast species isolated from healthy dogs. *Vet J*, 182(2), 320-326.

Brooks, G. F., Butel, J. S. y Morse, S. A. (2013). Medical microbiology. *United States, 25th*.

Brown, D. (2012). Probiotics for the treatment of bacterial vaginosis. *Altern Med Alert*, 15(3), 25-29.

Bybee, S. N., Scorza, A. V. y Lappin, M. R. (2011). Effect of the probiotic *Enterococcus faecium* SF68 on presence of diarrhea in cats and dogs housed in an animal shelter. *J Vet Intern Med*, 25(4), 856-860.

C

Charalampopoulos, D. y Rastall, R. A. (Eds.). (2009). *Prebiotics and probiotics science and technology* (Vol. 1), New York, Springer.

Carr, F. J., Chill, D. y Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit Rev Microbiol*, 28(4), 281-370.

Castro, L. A. y De Rovetto, C. (2006). Probióticos: utilidad clínica. *Colomb Med*, 37(4), 308-314.

Castro, A., González, M., Tarín, J. J. y Cano, A. (2015). Papel de los probióticos en Obstetricia y Ginecología. *Nutr Hosp*, 31(1), 26-29.

Cleff, M. B., Lima, A. P. D., Faria, R. O. D., Meinerz, A. R. M., Antunes, T. D. Á., Araújo, F. B. D. y Meireles, M. C. A. (2005). Isolation of *Candida* spp from vaginal microbiota of healthy canine females during estrous cycle. *Braz J Microbiol*, 36(2), 201-204.

Cleff, M. B., Xavier, M. O., Martins, A. A., Santin, R., y Meireles, M. C. A. (2007). Caracterización de la microbiota levaduriforme residente en la vagina de perras en diferentes fases del ciclo estral. *Arch Med Vet*, 39(2), 153-158.

Coconnier, M. H., Klaenhammer, T. R., Kerneis, S., Bernet, M. F. y Servin, A. L. (1992). Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture. *Appl Environ Microbiol*, 58(6), 2034-2039.

Collado, M. C., Gueimonde, M., Sanz, Y. y Salminen, S. (2006). Adhesion properties and competitive pathogen exclusion ability of bifidobacteria with acquired acid resistance. *J Food Prot*, 69(7), 1675-1679.

Concannon, P. W. (2009). Endocrinologic control of normal canine ovarian function. *Reprod Domestic Anim*, 44(s2), 3-15.

Concannon, P. W. (2010). Reproductive cycles of the domestic bitch. *Anim Reprod Sci*, 124, pp. 200–210.

Concannon, P. W., Weigand, N., Wilson, S. y Hansel, W. (1979). Sexual behavior in ovariectomized bitches in response to estrogen and progesterone treatments. *Biol Reprod*, 20(4), 799-809.

Consulta de Expertos, F. A. O. (2006). *Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación.*

Conway, P. L. y Kjelleberg, S. (1989). Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus fermentum* strain 737 to mouse stomach squamous epithelium. *J Gen Microbiol*, 135(5), 1175-1186.

Cribby, S., Taylor, M. y Reid, G. (2008). Vaginal microbiota an the use of probiotics. *Interdiscip Perpect infect Dis*, 2008.

Cunningham, J. G. y Klein, B. G. (2014). *Fisiología veterinaria*. Barcelona: Elsevier España.

D

del Campo-Moreno, R., Alarcón-Cavero, T., D'Auria, G., Delgado-Palacio, S. y Ferrer-Martínez, M. (2018). Microbiota en la salud humana: técnicas de caracterización y transferencia. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 36(4), 241-245.

Del Coco, V. F. (2015). Los microorganismos desde una perspectiva de los beneficios para la salud. *Rev Argent Microbiol*, 47(3), 171-173.

Dennis, J. y Hamm, B. L. (2012). Canine pyometra: Early recognition and diagnosis. *Vet. Med*, 107(5), 1-6.

Delucchi, L., Fraga, M., Perelmuter, K., Cidada, E. y Zunino, P. (2008). Vaginal lactic acid bacteria in healthy and ill bitches and evaluation of in vitro probiotic activity of selected isolates. *Can Vet J*, 49(10), 991-994.

Dobson, A., Cotter, P. D., Ross, R. P. y Hill, C. (2012). Bacteriocin production: a probiotic trait? *Appl Environ Microbiol*, 78(1), 1-6.

Doig, P. A., Ruhnke, H. L. y Bosu, W. T. (1981). The genital *Mycoplasma* and *Ureaplasma* flora of healthy and diseased dogs. *Can J Comp Med*, 45(3), 233.

Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S. y Kiely, B. (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am J Clin Nutr*, 73(2), 386s-392s.

Dyce, K. M., Sack, W. O. y Wensing, C. J. G. y Cozzi, B. (2009). *Textbook of veterinary anatomy*. Roma: Delfino.

E

EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), Rychen, G., Aquilina, G., Azimonti, G., Bampidis, V., Bastos, M. D. L. y Gropp, J. (2018). Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms. *EFSA Journal*, 16(3), e05206.

EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). (2012). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal*, 10(6), 2740.

England, G. C. y Heimendahl, A. V. (2010). *BSAVA manual of canine and feline reproduction and neonatology* (No. Ed. 2). British Small Animal Veterinary Association.

F

Falagas, M. E., Betsi, G. I. y Athanasiou, S. (2007). Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis. *Clinical Microbiol Infect*, 13(7), 657-664.

Fariña, J. (2011). Reproducción. En F. J. Cabrera y O. *Manual ilustrado de cinología* (pp. 89-96). Argentina: Consejo de Jueces de FCA.

Fernández Olmos, A., García de la Fuente, C., Saéz Nieto, J. A., y Valdezate Ramos, S. (2010). Métodos de Identificación Bacteriana en el Laboratorio de Microbiología. *Procedimientos en Microbiología Clínica* (Vol. 37).

Fons, M., Gomez, A. y Karjalainen, T. (2000). Mechanisms of colonisation and colonisation resistance of the digestive tract part 2: bacteria/bacteria interactions. *Microb Ecol Health Dis*, 12(2), 240-246.

Foster, R. A. (2012). Common lesions in the male reproductive tract of cats and dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 42(3), 527-545.

Fransson, B., Lagerstedt, A. S., Hellmen, E. y Jonsson, P. (1997). Bacteriological findings, blood chemistry profile and plasma endotoxin levels in bitches with pyometra or other uterine diseases. *J Vet Med Series A*, 44(1-10), 417-426.

Fredricks, D. N., Fiedler, T. L., y Marrazzo, J. M. (2005). Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. *N Engl J Med*, 353(18), 1899-1911

G

Gagné J. W., Wakshlag J. J., Simpson K. W., Down S. E., Latchman S., Brown D. A. y Fahey G. C. (2013). Effects of a synbiotic on fecal quality, short-chain fatty acid concentrations and the microbiome of healthy sled dogs. *BMC Vet Res*, 9(1), 246.

García, J., Cantón, R., García, E., Gómez, M., Martínez, L., Rodríguez-Avial, C. y Vila, J. (2000). Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades. Infecciosas y Microbiología Clínica.*

Getty, R., Grossman, J. D. y Sisson, S. (2001). *Anatomía de Los Animales Domésticos Tomo II.* Barcelona: Elsevier.

Girmé Vila, G. (2015). *Caracterització microbiològica i enzimàtica de la llet d'Euga gestant. Avaluació de les propietats probiòtiques, antimicrobianes i preservadores.* (Tesis Doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona.

Golinska, E., Strus, M., Sowinska, N., Witka, N., Szydlo, M. y Lenarczyk, J. (2017). The vaginal microbial community in various stages of the estrous cycle

of healthy female dogs and the one with genital tract infections. In *EVSSAR Congress*.

Gómez-Gallego, C., Junnila, J., Männikkö, S., Hämeenoja, P., Valtonen, E., Salminen, S. y Beasley, S. (2016). A canine-specific probiotic product in treating acute or intermittent diarrhea in dogs: A double-blind placebo-controlled efficacy study. *Vet Microbiol*, 197, 122-128.

Gomez-Lucía, E., Blanco, M. D. M. y Doménech, Ana. (2007). *Manual de inmunología veterinaria*. Madrid: Pearson Prentice Hall

González, C. (2018). Aplicación de *Lactobacillus* spp. como cultivos iniciadores de la fermentación de aceitunas verdes. (Trabajo de Fin de Grado). Universidad de Jaén. Jaén.

Granados Pérez, R., y Villaverde Peris, C. (2003). *Microbiología Tomo I*, Madrid, España, Thomson Paraninfo.

Groppetti, D., Pecile, A., Barbero, C. y Martino, P. A. (2012). Vaginal bacterial flora and cytology in proestrous bitches: Role on fertility. *Theriogenology*, 77(8), 1549-1556.

Guarner, F., Khan, A. G., Garisch, J., Eliakim, R., Gangl, A., Thomson, A. y Fedorak, R. (2017). Probióticos y prebióticos. *Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y prebióticos*, 1-29.

Guerrero, A. E., Stornelli, M. C., Jurado, S. B., Giacoboni, G., Sguazza, G. H., de la Sota, R. L., y Stornelli, M. A. (2018). Vaginal isolation of beta-haemolytic *Streptococcus* from bitches with and without neonatal deaths in the litters. *Reproduction in domestic animals*, 53(3), 609-616.

Gunay, U., Onat, K., Gunay, A. y Ulgen, M. (2010). Vaginal, cervical and uterine bacterial flora at the different stages of the reproductive cycle in ovariectomized bitches. *J Am Vet Adv*, 9(3): 478-481)

H

Hagman, R. y Kühn, I. (2002). *Escherichia coli* strains isolated from the uterus and urinary bladder of bitches suffering from pyometra: comparison by restriction enzyme digestion and pulsed-field gel electrophoresis. *Vet Microbiol*, 84(1-2), 143-153.

Hagman, R. (2018). Pyometra in Small Animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 48(4), 639-661.

Haller, D., Colbus, H., Gänzle, M. G., Scherenbacher, P., Bode, C. y Hammes, W. P. (2001). Metabolic and functional properties of lactic acid bacteria in the gastro-intestinal ecosystem: a comparative in vitro study between bacteria of intestinal and fermented food origin. *Syst Appl Microbiol*, 24(2), 218-226.

Hasiri, M. A., Gheisari, H. R. y Khademolhosseini, A. A. (2015). *Lactobacillus rhamnosus* as a probiotic for the health of adult dogs. *Int J Probiotics Prebiotics*, 10(2/3), 69.

Hashimoto, V., Anzai, E., Galhardo, J., Dias, J., Giordano, G., Pretto, L. y Freitas, J. (2002). Bacterial agents isolated from bitches with vaginitis. *Annual meeting of scientific initiation* (Vol. 11).

Henriksson, A., Szewzyk, R. y Conway, P. L. (1991). Characteristics of the adhesive determinants of *Lactobacillus fermentum* 104. *Appl Environ Microbiol*, 57(2), 499-502.

Hirsh, D. C. y Wiger, N. (1977). The bacterial flora of the normal canine vagina compared with that of vaginal exudates. *J Small Anim Pract* 18, 25-30.

Hoffmann, B., Riesenbeck, A. y Klein, R. (1996). Reproductive endocrinology of bitches. *Anim Reprod Sci*, 42(1), 275-288.

Bibliografía

Hutchins, R. G., Bailey, C. S., Jacob, M. E., Harris, T. L., Wood, M. W., Saker, K. E. y Vaden, S. L. (2013). The effect of an oral probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, and *Bacillus* species on the vaginal microbiota of spayed female dogs. *J Vet Inter Med*, 27(6), 1368-1371.

I

Ian, R.T. (2009). *Introducción a la inmunología veterinaria*. Barcelona: Elsevier

Iñiguez-Palomares, C. y Acedo-Félix, E. (2006). Mecanismos de adhesión al tracto intestinal y antagonismo de *Bifidobacterium*. *Revista de Salud Pública y Nutrición*, 7(2).

Inostroza, E. E. C. (2011). *Desarrollo de un preparado a base de una cepa de Lactobacillus y evaluación de su capacidad para restablecer la microbiota vaginal* (Tesis Doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona.

J

Janowski, T., Zduńczyk, S., Jurczak, A. y Socha, P. (2008). Incidence of *Mycoplasma canis* in the vagina in three groups of bitches. *Bull Vet Inst Pulawy*, 52, 533-535.

Johnston, S. D., Kustritz, M. V. y Olson, P. S. (2001). *Canine and feline theriogenology*. Philadelphia: Saunders.

Jugan, M. C., Rudinsky, A. J., Parker, V. J. y Gilor, C. (2017). Use of probiotics in small animal veterinary medicine. *J Am Vet Med Assoc*, 250(5), 519-528.

K

Kelley, R. L., Minikhiem, D., Kiely, B., O'Mahony, L., O'Sullivan, D., Boileau, T. y Park, J. S. (2009). Clinical benefits of probiotic canine-derived

Bifidobacterium animalis strain AHC7 in dogs with acute idiopathic diarrhea. *Vet Ther*, 10(3):121-130.

Kelley, R. L., Levy, K., Mundell, P., y Hayek, M. (2012). Effects of varying doses of a probiotic supplement fed to healthy dogs undergoing kenneling stress. *Int J Appl Res Vet Med*, 10(3), 205-216.

Khalid, K. (2011). An overview of lactic acid bacteria. *Int J Biosci*, 1(3), 1-13.

Kim, Y. G., Ohta, T. y Takahasi, T. (2006). *Lactobacillus casei* activates innates immunity via NK-Kappa and p38 MAP Kinase signalling pathways. *Microb Infect*, 8: 994-1005.

Koneman, E. W. y Allen, S. (2008). *Koneman. Diagnostico Microbiologico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas*, Buenos Aires, Argentina, Ed. Médica Panamericana.

König, H. E. y Liebich, H. G. (2005). *Anatomía de los animales domésticos: texto y atlas en color* (Vol. 2). Madrid: Médica Panamericana.

König, H. E., Fröhlich, J., Uden, G. (2009). Lactic acid bacteria. *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine* (pp. 3-41). Springer Science, New York.

Kustritz, M. V. R. (2006). Collection of tissue and culture samples from the canine reproductive tract. *Theriogenology*, 66(3), 567-574.

L

Lahtinen, S., Ouwehand, A. C., Salminen, S. y von Wright, A. (2012). *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. Broken Sound Parkway NW: CRC Press.

Laurusevičius, S. A., Šiugždaitė, J. y Žilinskas, H. (2008). Correlation between different sexual cycle stages and vaginal bacterial flora in bitches of different breeds. *Veterinarija ir Zootechnika*, 41(63), 76-79.

Lamm, C. G., Ferguson, A. C., Lehenbauer, T. W. y Love, B. C. (2010). Streptococcal infection in dogs: a retrospective study of 393 cases. *Vet Pathol*, 47(3), 387-395.

Ledbetter, E. C. y Starr, J. K. (2015). *Malassezia pachydermatis* keratomycosis in a dog. *Med Mycol Case Rep*, 10, 24-26.

Lee, J. H., Kim, M. J., Jeong, D. W., Kim, J. H., Chang, H. C., Chung, D. K., Kim, H. Y. y Kim, K. H. (2005). Identification of Bacteriocin-Producing *Lactobacillus paraplantarum* first isolated from Kimchi. *J Microb Biotech*, 15, 428-433.

López-Jácome, L., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., y Franco-Cendejas, R. (2015). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en Discapacidad*, 1(3), 10-18.

M

MacFaddin, J. F. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*, Buenos Aires, Argentina, Ed. Médica Panamericana.

Mackowiak, P. A. (2013). Recycling Metchnikoff: probiotics, the intestinal microbiome and the quest for long life. *Front Public Health*, 1, 52, 1-3.

Maksimović, A., Maksimović, Z., Filipović, S., Beširović, H. y Rifatbegović, M. (2012). Vaginal and uterine bacteria of healthy bitches during different stages of their reproductive cycle. *Vet Rec*, 171(15), 375

Bibliografía

Marsella, R. (2009) Evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG for the prevention of atopic dermatitis in dogs. *Am J Vet Res* 70(6), 735-740.

Marsella, R., Santoro, D y Ahrens, K. (2012). Early exposure to probiotics in a canine model of atopic dermatitis has long-term clinical and immunological effects. *Vet Immunol Immunopathol*, 146(2), 185-189.

Marsella, R. Santoro, D, Ahrens, K y Thomas, A. L. (2013). Investigation of the effect of probiotic exposure on filaggrin expression in an experimental model of canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol*, 24(2), 260-265

Martín, R., Soberón, N., Vázquez, F. y Suárez, J. E. (2008). La microbiota vaginal: composición, papel protector, patología asociada y perspectivas terapéuticas. *Enferm Infecc Microbiol Clín*, 26(3), 160-167.

Martínez-Cuesta, M. C., Peláez, C. y Requena, T. (2012). Probióticos en la salud humana. Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, Madrid.

Mastromarino, P., Vitali, B. y Mosca, L. (2013). Bacterial vaginosis: a review on clinical trials with probiotics. *New Microbiol*, 36(3), 229-238.

Mbugua, S. K. y Njenga, J. (1992). The antimicrobial activity of fermented uji. *Ecol Food Nutr*, 28(3), 191-198.

McVey, S., Kennedy, M. y Chengappa, M. M. (2013). *Veterinary Microbiology*. Iowa, USA. John Wiley & Sons, Inc.

Meloni, T., Alonge, S., Martino, P. A. y Veronesi, M. C. (2013). Whelping management in a bitch with vaginal beta-haemolytic streptococci. In *EVSSAR Congress*.

Mileti, E., Matteoli, G., Iliev, I. D. y Rescigno, M. (2009). Comparison of the immunomodulatory properties of three probiotic strains of *Lactobacilli* using complex culture systems; prediction for *in vivo* efficacy. *Plos One*, 4 (9): e7056

Muñoz, P., Morgaz, J. y Galán, A. (2015). Manual clínico del perro y el gato. Barcelona: Elsevier España.

Murphy, C., Murphy, S., O'Brien, F., O'Donoghue, M., Boileau, T., Sunvold, G y O'Mahony, L. (2009). Metabolic activity of probiotics - Oxalate degradation. *Vet Microbiol*, 136(1-2), 100-107.

N

Neihaus, S. A., Hathcock, T. L., Boothe, D. M. y Goring, M. L. (2001). Presurgical antiseptic efficacy of chlorhexidine diacetate and providone-iodine in the canine preputial cavity. *J Am Anim Hosp Assoc*, 47(6), 406-412.

Neish, A. S. (2009). Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*; 136(1): 65-80.

Ng, S. C., Hart, A. L., Kamm, M. A., Stagg, A. J. y Knight, S. C. (2008). Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflamm Bowel Dis*, 15(2), 300-310.

Niskanen, M. y Thrusfield, M. V. (1998). Associations between age, parity, hormonal therapy and breed, and pyometra in Finnish dogs. *Vet Rec*, 143, 493-498.

Noguchi, K., Tsukumi, K. y Urano, T. (2003). Qualitative and quantitative differences in normal vaginal flora of conventionally reared mice, rats, hamsters, rabbits, and dogs. *Comp Med*, 53(4), 404-412.

Núñez Moreno, C. E. y Rascón Díaz, C. R. (2009). *Ciclo estral de la perra* (Monografía). Universidad Autónoma Agraria, Torreón, México.

O

Ogawa, T., Asai, Y., Tamai, R., Makimura, Y., Sakamoto, H., Hashikawa, S., y Yasuda, K. (2006). Natural killer cell activities of synbiotic *Lactobacillus casei* ssp. *casei* in conjunction with dextran. *Clin Exp Immunol*, 143(1), 103-109.

Olson, P. N. y Mather, E. C. (1978). Canine vaginal and uterine bacterial flora. *J Am Vet Med Assoc* 171, 708-711.

O'Mahony, D., Murphy, K. B., MacSharry, J., Boileau, T., Sunvold, G., Reinhart, G. y O'Mahony, L. (2009). Portrait of a canine probiotic *Bifidobacterium* - from gut to gut. *Vet Microbiol*, 139(1-2), 106-112.

Orrego, C. (2008). *Congelación y liofilización de alimentos*. Manizales, Caldas, Colombia. Artes Gráficas Tizan Ltda.

O'Shea, E. F., Cotter, P. D., Stanton, C., Ross, R. P. y Hill, C. (2012). Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: bacteriocins and conjugated linoleic acid. *Int J Food Microbiol*, 152(3), 189-205.

P

Painting, K., y Kirsop, B. (1990). A quick method for estimating the percentage of viable cells in a yeast population, using methylene blue staining. *World J Microbiol Biotechnol*, 6(3), 346-347.

Perez, R. H., Zendo, T., y Sonomoto, K. (2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. In *Microbial Cell Fact* (Vol. 13, No. 1, p. S3). BioMed Central.

Prescott, L. M., Harley, J. P. y Klein, D. A. (2004). *Microbiología*, Madrid, España, McGraw-hill-interamericana de España, S.A.U.

Pretzer, S. D. (2008). Abnormalities of the Canine Estrous Cycle: A review. In *Article presented at the Canine Breeder's Symposium, St. Louis, Missouri* (pp. 41-49).

Price, L. B., Liu, C. M., Johnson, K. E., Aziz, M., Lau, M. K., Bowers, J. y Gray, R. H. (2010). The effects of circumcision on the penis microbiome. *PLoS One*, 5(1), e8422.

Provencio, D. M. (2011). *Caracterización de factores de adhesión a proteínas de la matriz extracelular en Lactobacillus Casei* (Tesis Doctoral). Universitat Politècnica de València. Valencia.

R

Ramírez J., Rosas, P., Velázquez, M., Ulloa, J. y Arce, F. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente*, 2, 1-16.

Reis, J. A., Paula, A. T., Casarotti, S. N. y Penna, A. L. B. (2012). Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. *Food Eng Rev*, 4(2), 124-140.

Rinne, M., Kalliomaki, M., Arvilommi, H., Salminen, S., y Isolauri, E. (2005). Effect of probiotics and breastfeeding on the bifidobacterium and lactobacillus/enterococcus microbiota and humoral immune responses. *J Pediatr*, 147(2), 186-191.

Root Kustritz, M. V. (2001). Disorders of the canine penis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 31(2), 247.

Ros, L., Holst, B. S. y Hagman, R. (2014). A retrospective study of bitches with pyometra, medically treated with aglepristone. *Theriogenology*, 82(9), 1281-1286.

S

Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Mättö, J. y Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J Biotechnol*, 84(3), 197-215.

Salminen, S. y Von Wright, A. (2004). *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. Broken Sound Parkway NW. CRC Press.

Sánchez Alzuria, N. (2015). *Evaluación del efecto probiótico de las cepas Lactobacillus reuteri CECT7266 y Lactobacillus fermentum CECT7265 en perros sanos*. (Tesis Doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona.

Sant'Anna, M. C., Kelliton Fabretti, A. y Mello Martins, M. I. (2012). Clinical approach to canine vaginitis. *Semina: Ciênc Agrár*, 33(4), 1543-1554.

Santos, C. M., Pires, M. C., Leão, T. L., Hernández, Z. P., Rodriguez, M. L., Martins, A. K. y Nicoli, J. R. (2016). Selection of *Lactobacillus* strains as potential probiotics for vaginitis treatment. *Microbiol*, 162(7), 1195-1207.

Saritas, Z. K., Konak, S., Pamuk, K., Korkmaz, M., Cevik-Demirkan, A. y Civelek, T. (2012). Identification and Antimicrobial Susceptibility of Microorganisms Isolated from the Preputium of Healthy Dogs. *J Anim Vet Adv*, 11(4), 553-555.

Sauter, S. N., Benyacoub, J., Allenspach, K., Gaschen, F., Ontsouka, E., Reuteler, G. y Blum, J. W. (2006). Effects of probiotic bacteria in dogs with food responsive diarrhoea treated with an elimination diet. *J Anim Physiol Anim Nutr*, 90(7-8), 269-277.

Schäfer-Somi, S. y Renner, F. (2018). Analysis of factors contributing to the individual change in the vaginal flora of bitches in estrus. In *EVSSAR Congress*.

Schultheiss, P. C., Jones, R. L., Kesel, M. L. y Olson, P. N. (1999). Normal bacterial flora in canine and feline uteri. *J Vet Diagn Invest*, 11(6), 560-562.

Schneitz, C., Nuotio, L. y Lounatma, K. (1993). Adhesion of *Lactobacillus acidophilus* to avian intestinal epithelial cells mediated by the crystalline bacterial cell surface layer (S-layer). *J Appl Microbiol*, 74(3), 290-294.

Schummer, A., Nickel, R., Aureli, G. y Ferrandi, B. (1979). *Trattato di anatomia degli animali domestici 2: Splanchnologia*. Milano: Ambrosiana.

Schwarzer, M., Srutkova, D., Schabussova, I., Hudcovic, T., Akgun, J. y Wiedermann, U. (2013). Neonatal colonization of germ-free mice with *Bifidobacterium longum* prevents allergic sensitization to major birch pollen allergen Bet v 1. *Vaccine*, 31(46): 5405-5412.

Senok, A. C., Verstraelen, H., Temmerman, M. y Botta, G. A. (2009). Probiotics for the treatment of bacterial vaginosis. *Cochrane Database Syst Rev*, (4).

Silva-Molano, R. F. y Loaiza-Echeverri, A. M. (2007). Piometra en animales pequeños. *Vet Zootec*, 1, 71-86.

Simpson, G. M., England, G. C. W. y Harvey, M. (1999). *Manual de reproducción y neonatología en pequeños animales*. Barcelona: Ediciones S.

Siugzdaite, J., Sengaut, J y Laurusevicius, L. A. (2019). Aerobic bacterial flora isolation from prepuce of stud dogs. In *EVSSAR Congress*.

Sjaastad, O. V., Hove, K., Sand, O. y Hove, K. (2010). *Physiology of domestic animals*. Oslo: Scandinavian veterinary press.

Smith-Carr, S. (2006). Canine artificial insemination. *Vet Tech*, 27(8), 474.

Bibliografía

Sokolowski, J. H. (1977). Reproductive patterns in the bitch. *Vet Clin North Am*, 7(4), 653.

Stephen, E. J. y Edward, C. F. (2007). *Tratado de medicina interna veterinaria. Enfermedades del perro y el gato*. Madrid: Elsevier España.

Stornelli, M. A., Cerdá, R. O., Gobello, C., Arauz, M. S. y Stanchi, N. O. (2000). Estudio de micoplasmas y bacterias aerobias en la vagina craneal de hembras caninas clínicamente sanas. *Analecta Vet*, 20(1), 36-38.

Suárez, E., Beltrán, D. A., Daza, M., González, S. P., Guerra, J. A., Jurado, A. R. y Rodríguez, J. M. (2012). La microbiota vaginal: composición y efectos beneficiosos. Consenso sobre usos de los probióticos en ginecología.

T

Trigo, F.J. y Valero, G. (2004). *Patología general veterinaria* México D.F.: D.R.© Universidad Nacional Autónoma de México.

V

Vahjen W. y Manner K. (2003). The effect of a probiotic *Enterococcus faecium* product in diets of healthy dogs on bacteriological counts of Salmonella spp., Campylobacter spp. and Clostridium spp. in faeces. *Arch Anim Nutr*, 57(3), 229-233.

Van Tassell, M. L. y Miller, M. J. (2011). *Lactobacillus* adhesion to mucus. *Nutrients*, 3(5), 613-636.

Vázquez, C., Martín, A., de Silóniz, M. I. y Serrano, S. (2011). Técnicas básicas de Microbiología. Observación de bacterias. *Reduca (Biología)*, 3(5).

Vigo, G. B., Giacoboni, G. I., Gagetti, P. S., Pasterán, F. G. y Corso, A. C. (2015). Resistencia antimicrobiana y epidemiología molecular de aislamientos

Bibliografía

de *Staphylococcus pseudintermedius* de muestras clínicas de caninos. *Rev Argen Microbiol*, 47(3), 206-211.

W

Watts, J. R., Wright, P. J. y Whithear, K. C. (1996). Uterine, cervical and vaginal microflora of the normal bitch throughout the reproductive cycle. *J Small Anim Pract*, 37(2), 54-60.

Wayne, P. A. (2002). National committee for clinical laboratory standards. *Performance standards for antimicrobial disc susceptibility testing*, 12, 01-53.

West, N. P., Pyne, D. B., Peake, J. M. y Cripps, A. W. (2009). Probiotics, immunity and exercise: a review. *Exerc Immunol Rev*, 15(107), e26.

Wheaton, R. H., Jonhson, A. L., Parker, A. J. y Kneller, S.K. (1989). Results and complications of surgical treatment of piometra: A review of 80 cases. *J Am Anim Hosp Assoc*,

Wright, A. V. (2005). Regulating the safety of probiotics-The European approach. *Curr Pharm Des*, 11(1), 17-23.

Wynn, S. G. (2009). Probiotics in veterinary practice. *J Am Vet Med Assoc*, 234(5), 606-613.

Y

Ya, W., Reifer, C. y Miller, L. E. (2010). Efficacy of vaginal probiotic capsules for recurrent bacterial vaginosis: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Am J Obstet Gynecol*, 203(2), 120-e1.

Bibliografía

Z

Zachary, J.V. y McGavin, D.M. (2008). *Patología generale veterinaria*. Milano: Elsevier Masson.

