



Nota Corta [Short note]

**EFFECTO DEL ACETATO DE FLUOROGESTONA EN LA MICROBIOTA VAGINAL DE BORREGAS PELIBUEY EN LA CUENCA DEL PAPALOAPAN**

**[EFFECT OF FLUOROGESTONE ACETATE ON THE VAGINAL MICROBIOTA FROM EWES PELIBUEY IN THE PAPALOAPAN REGION]**

**Nohemí Gabriela Cortés-López<sup>1</sup>, José Abad-Zavaleta<sup>1</sup>,  
Humberto Rafael Bravo-Delgado<sup>1</sup>, Víctor Manuel Meza-Villalvazo<sup>1</sup>,  
Bernardo Sachman-Ruiz<sup>3</sup>, César García-Arellano<sup>2</sup>,  
Sandra Trinidad del Moral Ventura<sup>\*1</sup>**

<sup>1</sup>Universidad del Papaloapan. Instituto de Biotecnología. Circuito Central No. 200, Col. Parque Industrial. CP. 68301. Tuxtepec, Oaxaca, México. Tel. (287) 87 59 2 40, ext. 220. Email: smoral@unpa.edu.mx,

<sup>2</sup>Univ. Papaloapan. Instituto de Agroingeniería. Av. Ferrocarril S/N, Col. Cd. Universitaria, C.P. 68400. Loma Bonita, Oax., México. Tel:(281) 872-22-37, ext. 220.

<sup>3</sup>Centro de Ciencias Genómicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 2001. Col. Chamilpa. Cuernavaca, Morelos, México.

Email: bsachman@ccg.unam.mx

\*Corresponding author

**RESUMEN**

Las ovejas son animales poliéstricos estacionales, para aumentar la fertilidad se recurre a la sincronización con esponjas intravaginales impregnadas con acetato de fluorogestona (FGA). Sin embargo, su uso promueve vaginitis, eritema e interfiere con la fertilidad. Se estudió el efecto de esponjas vaginales impregnadas con FGA sobre la microbiota bacteriana vaginal ovina. Para ello se usaron 15 ovejas de la raza Pelibuey, 5 animales por tratamientos: control (TC) esponja con y sin FGA (TFGA y TSFGA respectivamente). Las muestras microbiológicas fueron tomadas en tres tiempos, antes de colocar el dispositivo (t=0 h), al retiro (t= 288 h), y 56 h post-retiro dispositivo (t= 344 h). Las muestras fueron cultivadas en medios selectivos y se cuantificó las UFC en cada uno de los tratamientos. En la microbiota del TC se encontraron cepas de *Escherichia* y *Klebsiella*, sin embargo, en los TFGA y TSFGA, al retiro del dispositivo, se encontraron bacterias enteropatógenas coliformes y oportunistas como *Shigella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *E. coli*, *Pseudomonas* y *Acinetobacter*. Asimismo, se realizaron pruebas de sensibilidad con doce antibióticos a las cepas identificadas *in vitro*, mostrando la mayoría de ellas sensibilidad a enoxacina, trimetoprim-sulfametoxazol, ceftriaxona, cloranfenicol y ampicilina. En conclusión, el uso de esponjas vaginales promueve la inflamación del tracto vaginal e incrementa la presencia de bacterias coliformes y patógenos oportunistas causantes de la vaginitis.

**Palabras clave:** Esponjas intravaginales; vaginitis; ovejas; microbiota bacteriana.

**SUMMARY**

Ewes are polyoestrous seasonal animals, however in order to increase their fertility, progesterone derivatives are used by means of impregnated sponges with 20 mg of fluorogestone acetate (FGA). Nevertheless, the use of sponges with FGA generates vaginitis, erythema and interferes with fertility. This paper studies the effect of FGA and sponge over the microbiota vaginal in ewes anestrus. To obtain experimental samples, fifteen ewes anestrus were used. Five ewes were used as control group. Ten ewes anestrus were used and data were collected before, withdrawal and 56 h after withdrawal of sponges with and without FGA, in order to quantify, identify and evaluate changes in the vaginal bacterial microbiota. In the normal microbiota were found *Escherichia* and *Klebsiella* strains; however, after removal of the devices, were found enteropathogenic coliform bacteria and some opportunistic as *Shigella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *E. coli*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. Also found that the device without FGA, induces a change in the vaginal microbiota, thus, causes vaginitis. *In vitro* sensitivity tests were performed on the strains identified using twelve different antibiotics; the results showed a higher sensibility to enoxacin, then to the trimetoprim-sulfamethoxazole, ceftriaxone, chloramphenicol and ampicillin. Antibiotics use is necessary to prevent the vaginitis in ewes with dispositive. In conclusion, the intravaginal sponges promote of the vagina inflammation and produce coliform bacteria in vagina.

**Key words:** intravaginal sponge; vaginitis; ewes; bacterial microbiota.

## INTRODUCCIÓN

Los mamíferos como la vaca (*Bos taurus-indicus*), la oveja (*Ovis aries*), la cabra (*Capra hircus*), la perra (*Canis familiaris*) y la mujer (*Homo sapiens*), presentan en su vagina, una microbiota mixta, compuesta por microorganismos aerobios, anaerobios facultativos y anaerobios estrictos (Otero *et al.*, 2000; Stornelli *et al.*, 2000; Alba y Silveira, 2006). En esta comunidad microbiana se incluyen a saprófitos, patógenos potenciales y oportunistas, en general no son dominantes, su abundancia está determinada por las limitaciones del ambiente, es decir, pueden proliferar y producir enfermedades bajo ciertas condiciones. Las diversas poblaciones de microorganismos están dotadas enzimáticamente para sobrevivir y multiplicarse en un ambiente vaginal dado, sólo las mejor adaptadas para multiplicarse y competir por los nutrientes pueden establecerse y contribuir a la microbiota o incluso sustituir a otros microorganismos (Hafez, 2002).

Las ovejas (*Ovis aries*) son poliéstricas estacionales, de modo que paren durante la época más favorable del año, la primavera, sin embargo, en las zonas tropicales tienden a reproducirse todo el año. Para incrementar la fertilidad se utilizan progestágenos que pueden ser administrados por vía oral, subcutánea o intravaginal, ya sean naturales o sintéticos (Yesilmen *et al.*, 2008; Hafez, 2002). En la actualidad, el método más utilizado de sincronización de estro en la industria de los pequeños rumiantes, es el uso de esponjas intravaginales impregnadas con acetato de fluorogestona (FGA), ya que ha mostrado una alta eficiencia en el control y presencia de celo dentro y fuera de temporada reproductiva. Además, el uso y manejo de este dispositivo es relativamente sencillo y no requiere de personal capacitado para su uso y aplicación. Sin embargo, el uso de esponjas intravaginales generalmente ocasiona vaginitis, generando flujo anormal, putrefacto y en algunas ocasiones hemorrágico. Esta sintomatología está relacionada con el aumento de la microbiota normal bacteriana, principalmente de bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* y *Klebsiella spp.* (Martins *et al.*, 2009).

En algunos estudios, como el de Ungerfeld y Silva (2005), se demostró que la vaginitis es causada por la esponja, como cuerpo absorbente extraño. Sin embargo, en bovinos, ovejas y cerdos, se ha reportado que la progesterona tiene efectos depresores sobre el sistema inmune (Lewis, 2003), por lo que el progestágeno podría ser parcialmente responsable del aumento en el número de la carga bacteriana (Sheldon *et al.*, 2006). Por lo tanto, la vaginitis podría ser consecuencia de la esponja, por la absorción y retención del fluido, y/o por la inmunosupresión local inducida por la hormona. Hasta el momento no se ha

determinado la importancia de los progestágenos ni de la esponja en la vaginitis provocado por las esponjas intravaginales, por lo que este trabajo busca determinar el efecto tanto del progestágeno como de la esponja en infecciones vaginales. Además, de acuerdo a nuestro conocimiento aún no se ha determinado el tipo de bacterias que proliferan durante la sincronización ni qué tipo de antibióticos se podrían utilizar para tratar la infección de manera específica, sin que éste cause un efecto secundario en la fertilidad de las ovejas y en la calidad del semen al momento de la inseminación o monta natural. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del progestágeno y de la esponja sobre la microbiota vaginal ovina durante la sincronización. Así mismo, se evaluó la susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* frente a diversos antibióticos, amikacina, ampicilina, cefalotina, ceftriaxona, cloranfenicol, dicloxacilina, enoxacina, eritromicina, gentamicina, netilmicina, penicilina y trimetoprim-sulfametoxazol.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Localización, unidades experimentales y tratamientos

El presente trabajo se realizó en la posta zootécnica de la Universidad del Papaloapan (UNPA) campus Loma Bonita, en el Estado de Oaxaca, perteneciente a la baja cuenca del Papaloapan, la cual se localiza al noreste del estado en la latitud norte 18° 05' y en la latitud oeste de 96° 08', a una altitud de 20 m sobre el nivel del mar. La cuenca del Papaloapan es una región tropical húmeda, con una temperatura y precipitación promedio anual de 33°C y 3000 mm, respectivamente (OEIDRUS-OAXACA, 2005).

### Animales, alimentación y tratamientos

Se utilizaron 15 ovejas adultas, multíparas y secas de la raza Pelibuey, con una condición corporal de 3 en la escala de 1 a 5 de acuerdo a Russel (1969). Las ovejas fueron mantenidas en pastoreo y suplementadas con 300 g de alimento comercial por animal por día y distribuidas al azar en tres tratamientos: tratamiento control (TC, n=5), tratamiento esponja vaginal impregnada con 20 mg de FGA (TFGA, n=5) y tratamiento esponja vaginal sin FGA (TSFGA, n=5), la esponja se mantuvo insertada por 14 días.

### Colecta de muestras

En todos los tratamientos, las muestras fueron tomadas en tres tiempos, antes de colocar el dispositivo (t=0 h), después del retiro del dispositivo (t=288 h, 14 días), y 56 h post-retiro (t=344 h, 16h). En todos los casos las muestras fueron tomadas con un hisopo estéril, el cual fue depositado en un tubo

con solución nutritiva y transportado al laboratorio para su análisis. Las muestras se incubaron por 24 h a 38°C y posteriormente fueron sembradas por dilución en diversos medios de cultivo.

### **Cultivo y conteo de unidades formadoras de colonias (UFC)**

Después de la incubación, se realizaron diluciones sucesivas en agua peptonada 10% y se sembraron en: agar nutritivo, agar McConkey, XLD y EMB. Las cajas sembradas fueron incubadas a 38°C durante 48 h. La cuenta de UFC se llevó a cabo en las cajas de agar nutritivo, con el contador de colonias digital marca Hinotek, modelo J-2. Posteriormente se aislaron cepas de acuerdo a su morfología macroscópica y se almacenaron en glicerol 20% a -20°C para su análisis posterior.

### **Análisis estadístico**

Los resultados experimentales fueron analizados por medio de un análisis de varianza (ANOVA), mediante el paquete estadístico SPSS, el análisis estadístico incluye los factores tratamiento y tiempo de incubación; así como una transformación logarítmica para la normalización de la distribución de los datos.

### **Pruebas de sensibilidad a antibióticos**

Las pruebas de sensibilidad se realizaron *in vitro* de acuerdo al manual de multidiscos combinados CAT (BIO-RAD) que contienen Amikacina (AK 30 µg), Ampicilina (AM 10 µg), Cefalotina (CF 30 µg), Ceftriaxona (CRO 30 µg), Cloranfenicol (CL 30 µg), Dicloxacilina (DC 1 µg), Enoxacina (ENX 10 µg), Eritromicina (E 15 µg), Gentamicina (GE 10 µg), Netilmicina (NET 30 µg), Penicilina (PE 10 U) y Trimetoprim-Sulfametoxazol (SXT 25 µg). Las cepas se sembraron en caldo Müeller-Hinton por 5 h a 35 °C para obtener una suspensión microbiana. Se midió turbidez utilizando como estándar BaCl<sub>2</sub> 0.048 M (1.175 % peso/volumen de BaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O) con 99.5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1 % v/v (0.36 N), ajustando la turbidez del inóculo con caldo estéril a 2U de DO<sub>600 nm</sub>. La suspensión microbiana se utilizó para sembrar en placas Müeller-Hinton mediante el método Kirby-Bauer. Las cajas sembradas fueron incubadas por 18 h a 38 °C.

### **Identificación y caracterización de cepas bacterianas**

Las cepas fueron identificadas con base en sus características bioquímicas y moleculares. La caracterización bioquímica se realizó utilizando galerías API 20E (bioMerieux) para bacterias Gram negativas, siguiendo las indicaciones del proveedor.

Para la caracterización molecular, se extrajo el ADN genómico utilizando el kit Ultra Clean microbial DNA isolation (MOBIO) siguiendo las recomendaciones del proveedor. Posteriormente, se amplificó el gen 16S DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando 20 ng de ADN genómico, 10 µM del oligonucleótido fD1 (CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTG GCTCAG) y rD1 (CCCGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAG CC) (Weisburg *et al.*, 1991) en 50 µL de reacción del kit Platinum PCR super Mix (Invitrogen). La PCR se realizó en el termociclador MAXYGENE (AXYGEN Scientific®) siguiendo las condiciones de reacción: 1 ciclo 94 °C 5 min; 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 56.1 °C por 30 s y 72 °C durante 30 s; finalmente 1 ciclo 72 °C por 10 min. Las amplificaciones después de haberse analizado por electroforesis se observaron en el sistema de fotodocumentación INGENIUS SYNGENNE®. Los productos de PCR obtenidos fueron purificados y secuenciados por MacroGen Inc. Korea. El análisis filogenético se realizó bajo el método de máxima verosimilitud, con el modelo Tamura Nei, y 1500 réplicas de Bootstrap.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Las UFC en el día cero (0 h) en los tres tratamientos mostraron en promedio  $5.7 (\pm 0.8) \times 10^7$  UFC. Al retiro del dispositivo, en el día 14 (288h), los tratamientos TFGA y TSFGA presentaron un incremento de la microbiota de 8 órdenes de magnitud ( $575000000 (\pm 300) \times 10^7$  UFC/ml) con respecto al tratamiento TC ( $6.9 (\pm 0.7) \times 10^7$  UFC/ml). Para el día 16 (344h) la microbiota en los tratamientos TCFGa y TSFGa, disminuyó a  $20 (\pm 0.5) \times 10^7$ , sin embargo la cuenta microbiana fue mayor comparado con el TC (Figura 1). En todos los tiempos, los TFGA y TSFGA no mostraron diferencia ( $P < 0.05$ ). La concentración bacteriana aumentó en los TFGA y TSFGA después de 14 días de retener la esponja (Figura 1). El resultado del análisis estadístico a las pruebas experimentales, concluye que no existe diferencia significativa en el desarrollo bacteriano causado por el FGA, por lo tanto la presencia de vaginitis en las borregas puede atribuirse directamente al uso de los dispositivos y no del progestágeno, es decir el FGA no tuvo un efecto significativo en el desarrollo bacteriano. La presencia de la esponja en la vagina incrementó la secreción mucosa y por lo tanto promovió la vaginitis. Algunos reportes en cabras indican que el uso de esponjas intravaginales estimulan la inflamación, promueven el mal olor y secreciones purulentas (Romano, 2004). Además, de acuerdo a lo reportado por Suarez *et al.* (2006), no hay cambio en la concentración bacteriana después del día 5 hasta el día del retiro de la esponja.

Tabla 1. Sensibilidad de las cepas a diferentes antibióticos

CEPA	AK	AM	CF	CRO	CL	DC	ENX	E	GE	NET	PE	SXT
<i>Pseudomonas sp</i> G11	R	S	I	I	R	R	S	R	R	R	R	S
<i>Escherichia coli</i> G22A	I	R	R	I	I	R	S	R	R	R	R	S
<i>Shigella sp</i> G22B	R	S	S	I	S	R	S	R	R	R	R	I
<i>Shigella sp</i> G22C	R	R	R	I	R	R	I	R	R	R	R	I
<i>Bacillus sp</i> G22D	I	I	R	I	S	R	S	R	R	R	R	S
<i>Acinetobacter sp</i> G31	I	R	R	R	S	R	I	I	R	S	R	R
<i>Bacillus sp</i> G33	R	I	I	I	R	R	S	R	R	R	R	S
<i>Citrobacter sp</i> G41	R	S	R	I	S	R	S	R	R	R	R	S
<i>Enterobacter sp</i> G42A	I	R	R	I	S	R	I	R	R	I	R	S

AK, Amikacina; AM, Ampicilina; CF, Cefalotina, CRO, Ceftriaxona; CL, Cloranfenicol; DC, Dicloxacilina; ENX, Enoxacina; E, Eritromicina; GE, Gentamicina; NET, Netilmicina; PE, Penicilina; SXT, Trimetoprim-Sulfametoxazol. R = Resistente; I = Intermedio; S = Sensible

Aunque algunos estudios señalan que las esponjas impregnadas con progestágenos tienen efecto inmunosupresor local que reducen la proliferación de linfocitos y  $PGF_{2\alpha}$ , y por lo tanto disminuyen la capacidad del organismo para prevenir o evitar infecciones (Lewis, 2003). En este estudio los datos indican que el FGA no tuvo efecto sobre el desarrollo de la vaginitis, sin embargo la esponja promovió el aumento en la cuenta total de bacterias causando el desarrollo de la vaginitis. Los resultados del presente trabajo coinciden con lo reportado por Yesilmen et al. (2008), en donde se señala que la progesterona no tuvo efecto en la cuenta total de bacterias de la microbiota vaginal, excepto por los cambios causados por el tratamiento con esponjas intravaginales. También, otros estudios reportan que cuando se han

utilizado tampones humanos o dispositivos liberadores de medicamentos controlados (CIDR) impregnados con progestágeno para la sincronización de ovejas, se reducen las lesiones y secreciones vaginales comparadas con las producidas por esponjas (Martins et al., 2010), debido principalmente a que el material de estos dispositivos no permite la acumulación de fluidos. Es evidente que el uso de esponjas intravaginales promueve la proliferación de bacterias que causan vaginitis, ya que evita que las secreciones normales de la vagina salgan por la vulva y por lo tanto se acumulan en el dispositivo.

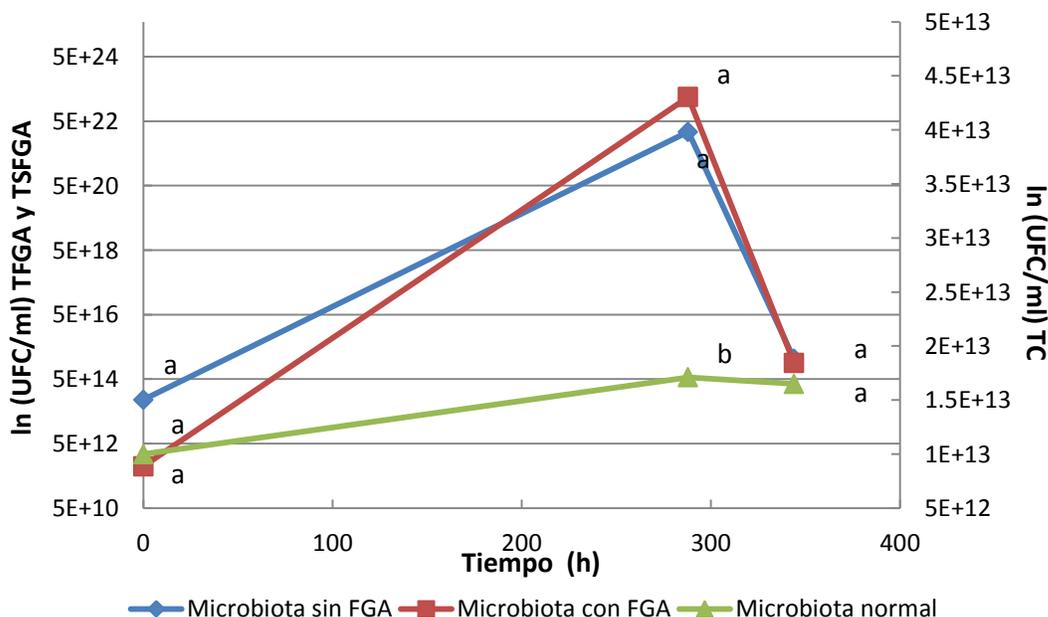


Figura 1. Cuenta bacteriana expresada en ln (UFC/ml) en diversas etapas del proceso, 0 h (inicio), 288 h (14 días, al retiro) y 344 h (16 días, 56 h después del retiro).

## Microbiota vaginal bacteriana

Se observó que en el  $t=0$  h en todos los tratamientos se encontraron las mismas especies *Escherichia coli* y *Salmonella*, cabe mencionar que para el TC estas especies no se modificaron a lo largo del tiempo. Sin embargo, para los TFGA y TSFGA en el  $t=288$  h (14 h), se encontraron bacterias enteropatógenas, como *Shigella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *E. coli*, además de patógenos oportunistas como *Pseudomonas* y *Acinetobacter*, así mismo únicamente se encontró un género de bacterias Gram positivas: *Bacillus*. El desarrollo de microorganismos patógenos oportunistas, en este caso, se debe a la acumulación de fluidos provocados por la esponja. Entre los microorganismos reportados que causan vaginitis ovina se encuentran cepas de *Shigella* y *Klebsiella* incluso cepas como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Listeria* y *Corynebacterium* se les ha relacionado con abortos y/o dificultad para la concepción (Shallali *et al.*, 2001), sin embargo éstas últimas no fueron aisladas en este trabajo. Los resultados de las pruebas de sensibilidad *in vitro* indicaron que todas las cepas analizadas fueron resistentes a dicloxacilina, penicilina y gentamicina, aunque son sensibles a enoxacina, por lo que puede ser el antibiótico de primera elección para el control de la vaginitis (tabla 1). De acuerdo a lo reportado por Barletta *et al.*, (1995), la enoxacina no causa daños en el semen ni tiene efecto sobre la reproducción, por lo que podría ser el antibiótico de primera elección. También se puede utilizar trimetoprim-sulfametoxazol como segunda elección, ceftriaxona, cloranfenicol y ampicilina sucesivamente, ya que son los antibióticos a los que son susceptibles las bacterias analizadas (tabla 1). Una medida de evitar procesos de vaginitis en ovejas sincronizadas con esponjas impregnadas con FGA, es recomendable un adecuado manejo profiláctico que puede incluir desde la desinfección del área vulvar hasta el uso de antibióticos durante los primeros 5 días del uso del dispositivo, asimismo, de manera alternativa, se podrían usar otro tipo de dispositivos menos porosos que eviten la acumulación de fluidos en la vagina. Es claro que el poliuretano provoca procesos de proliferación bacteriana, mismos que hacen necesario que se generen investigaciones como ésta para determinar el tipo de microorganismos patógenos causantes de la vaginitis en los procesos de sincronización de estro. Además, este trabajo propone que antibióticos podrían ser útiles para el control de dicha enfermedad. Actualmente, se están realizando pruebas de fertilidad *in vitro* en presencia de las cepas patógenas aisladas con la finalidad de identificar su

efecto en los procesos de fertilidad y con ello mejorar la eficiencia reproductiva en los rebaños ovinos.

En la taxonomía de las cepas aisladas en el presente trabajo se observó en el análisis filogenético (dendograma no mostrado) que las cepas aisladas como G33, G22D, G11 se encuentran en la misma rama filogenética (clado) que *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericus* y *Pseudomonas putida*, respectivamente, indicando que pertenecen a esas especies. Sin embargo, se encontraron especies nombradas como G41, G42A, G22C, G22B no se encuentran relacionadas con ninguna especie reportada hasta la fecha, por lo que podrían ser nuevas especies patógenas oriundas de la región del Papaloapan. Este es el primer reporte donde se relaciona el aumento de cuenta bacteriana con el tipo de microorganismos presentes en vaginitis causada por sincronización por esponjas bajo condiciones tropicales.

Se sugiere que cuando se utilice esta técnica para la sincronización de estros, se consideren todas las medidas de higiene posibles para controlar algunos factores que favorezcan el incremento de microorganismos patógenos que provocan la vaginitis, como la desinfección de la vulva, uso de guantes por parte del operador, así como también la aplicación de antibióticos al momento de la inserción del dispositivo. Otra alternativa es el uso de dispositivos como el CIDR y tampones humanos, los cuales son menos porosos que el polipropileno.

## Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por PROMEP 2009-02 103.5/11/6149 y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) 154683.

## CONCLUSION

El uso de esponjas vaginales, independientemente del contenido de la esponja, promueve la inflamación del tracto vaginal e incrementa la presencia de bacterias coliformes y patógenos oportunistas causantes de la vaginitis como *Shigella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *E. coli* además de patógenos oportunistas como *Pseudomonas* y *Acinetobacter*. Sin embargo, el uso de antibióticos al momento de la inserción del dispositivo sumado al manejo profiláctico adecuado pueden actuar como una medida de control de la enfermedad.

## REFERENCIAS

- Alba, L.O., Silveira, E.A. 2006. La leucorrea vaginal bovina de carácter no inflamatorio y su significación clínica. *Revista Electrónica de Veterinaria. REDVET.* VII(10).
- Barletta, D., Monzani, F., Gasperi, M., Caraccio, N., Maccanti, O., Bellitti, P., Bonadio, M. and Pucci, E. 1995. Efficacy of enoxacin in the treatment of prostatitis-vesiculitis: its absence of toxicity on spermatogenesis. *Presse Médicale.* 24(22):1025-7
- Hafez, E.S.E. 2002. Anatomía funcional de la reproducción. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ª ed. Mc Graw Hill. España. 519 pp.
- Lewis, G.S. 2003. Steroidal regulation of uterine resistance to bacterial infection in livestock. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 1:117–124.
- Martins, G., Figueira, L., Penna, B., Brandão, F., Vargas, R., Vasconcelos, C. and Lilenbaum, W. 2009. Prevalence and antimicrobial susceptibility of vaginal bacteria from ewes treated with progestin-impregnated intravaginal sponges. *Small Ruminant Research.* 81:182–184.
- Martins, L.T., dos Santos, P.C., Neto, S.G., Rauber, L.P., Bertolini, M., Vieira, A.D. and Mezzalana, A. 2010. Microbiological and functional evaluation of an alternative device (OB) for estrous synchronization in ewes. *Ciencia Rural (Brasil).* 40:389-395
- Oficina Estatal de Información para el Desarrollo Rural Sustentable (OEIDRUS). Tarjeta distrital de información estadística básica. 2005. Distrito 06 Tuxtepec. Oaxaca, México.
- Otero, C., Saavedra, L., Silva De Ruiz, C., Wilde, O., Holgado, A.R. and Nader-Macías, M.E. 2000. Vaginal bacterial microflora modifications during the growth of healthy cows. *Letter in Applied Microbiology.* 31:251-254.
- Romano, J.E. 2004. Synchronization of estrus using CIDR, FGA or MAP intravaginal pessaries during the breeding season in Nubian goats. *Small Ruminant Research.* 55:15-19.
- Russel, A.J., Doney, J. M., Gunn, R. G. 1969. Subjective assessment of fat in live sheep. *Journal of Agricultural Science.* 72: 451-454.
- Shallali, A.A., Hussein, A.M., Salih, M.M. and Dafalla, E.A. 2001. A Preliminary Report on Bacteria isolated from the Female Genital Tract of Sudanese Sheep and Goats. *The Sudan Journal of Veterinary Research.* 17:55-63.
- Sheldon, I.M., Lewis, G.S., LeBlanc, S. and Gilbert, R.O. 2006. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology* 65:1516–1530.
- Stornelli, M.A., Cerdá, R.O., Gobello, M.C., Arau, M.S. and Stanchi, N.O. 2000. Estudio de micoplasmas y bacterias aerobias en la vagina craneal de hembras caninas clínicamente sanas. *Analecta Veterinaria.* 20:36-38.
- Suarez, G., Zunino, P., Carol, H. and Ungerfeld, R. 2006. Changes in the aerobic vaginal bacterial mucous load and assessment of the susceptibility to antibiotic after treatment with intravaginal sponges in anestrous ewes. *Small Ruminant Research.* 63:39–43.
- Ungerfeld, R. and Silva, L. 2005. The presence of normal vaginal flora is necessary for normal sexual attractiveness of estrous ewes. *Applied Animal Behavior Science.* 93:245–250.
- Weisburg, W.G., Barns S.M., Pelletier, D.A. and Lane, D.J. 1991. 16s Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology.* 173:697-703
- Yesilmen, S., Ozyurtlu, N., Kucukaslan, I. and Altan F. 2008. The effect of Progestagen on the Changes of the Vaginal Flora Arising from Intravaginal sponge Treatment and Susceptibility of the Vagina Flora to Antibiotics in Ewes. *Journal of Animal and Veterinary Advances.* 7:1418-1421.

*Submitted February 27, 2012– Accepted June 12, 2012  
Revised received April 04, 2013*