

TESIS DOCTORAL

MICROBIOTA NATIVA DEL TRACTO REPRODUCTOR BOVINO (TRB): CARACTERIZACION DE CEPAS DE *Escherichia coli* PATOGÉNICAS Y SENSIBILIDAD FRENTE A EXTRACTOS VEGETALES



Méd. Vet. Candelaria Gonzalez Moreno

2018





UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN
FACULTAD DE BIOQUIMICA QUIMICA Y FARMACIA
Ayacucho 471 - T. E. 0054 381 4107215 - FAX 0054 381 4248169
T4000CAN – San Miguel de Tucumán – República Argentina



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN
FACULTAD DE BIOQUIMICA QUIMICA Y FARMACIA**

Tesis Doctoral

**“MICROBIOTA NATIVA DEL TRACTO REPRODUCTOR BOVINO
(TRB): CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *Escherichia coli*
PATOGENICAS Y SENSIBILIDAD FRENTE A EXTRACTOS
VEGETALES”**

Méd. Vet. Candelaria Gonzalez Moreno

Directora: Dra. María Claudia Otero



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN
FACULTAD DE BIOQUIMICA QUIMICA Y FARMACIA
Ayacucho 471 - T. E. 0054 381 4107215 - FAX 0054 381 4248169
T4000CAN – San Miguel de Tucumán – República Argentina



HONORABLE CONSEJO DIRECTIVO

Mag. Adriana Correa Zeballos
Dr. Manuel Javier Aybar
Dra. Viviana Andrea Rapisarda
Bioq. Esp. Ana Verónica Oldano
Dra. Ana Lucrecia Iruzubieta Villagra
Dra. María Antonieta Gordillo
Bioq. Esp. Vanesa Estela Quiroga
Sr. Mario Rodríguez
Sr. Joaquín Hernán Vargas
Srta. Elizabeth Abigail Gutiérrez
Srta. Karen Nahir Ríos

DECANO

Dr. Edgardo Hugo Cutin

VICE-DECANA

Dra. Inés del Carmen Ramos

SECRETARIA DE ASUNTOS ACADEMICOS

Dra. Marta Elena Cecilia

JEFA DEL DEPARTAMENTO POSGRADO

Lic. Marta Inés Quinteros



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN
FACULTAD DE BIOQUIMICA QUIMICA Y FARMACIA
Ayacucho 471 - T. E. 0054 381 4107215 - FAX 0054 381 4248169
T4000CAN – San Miguel de Tucumán – República Argentina



DEPARTAMENTO DE POSGRADO

AUTORIDADES:

DIRECTOR:

Dr. Sergio Enrique Pasteris

CONSEJO TITULAR:

Dra. Inés del Carmen Ramos

Dra. María Carolina Navarro

Dra. Maria Cristina Gaudioso

Dra. Paula Andrea Vincent

Dra. Maria Cristina Rubio

Suplentes

Dra. Maria Graciela Benzal

Dra. Clara del Valle Silvia de Ruiz

Dra. María Inés Nieva Moreno

Dra. Claudia Alejandra Crespo

Dra. María Angélica Véliz

REPRESENTANTE DE POSGRADO

ANTE LA SECRETARÍA DE POSGRADO DE LA UNT

Dra. Paula Andrea Vincent



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN
FACULTAD DE BIOQUIMICA QUIMICA Y FARMACIA
Ayacucho 471 - T. E. 0054 381 4107215 - FAX 0054 381 4248169
T4000CAN – San Miguel de Tucumán – República Argentina



**TRABAJO DE POSGRADO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO ACADÉMICO
SUPERIOR DE DOCTOR/A EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

CARRERA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Acreditado y Categorizado A ante la
Comisión Nacional de Acreditación Universitaria (CONEAU)
Resolución n°: 615/07

Acreditado y Categorizado A ante la
Comisión Nacional de Acreditación Universitaria (CONEAU)
Resolución n°: Resolución 750- CONEAU -13

Director:

Dr. Atilio Pedro Castagnaro

Vice-Directora:

Dra. Lucia Claps

Comité Académico:

Dr. Alfredo Grau

Dr. Raúl Pedraza

Dra. Silvina Fadda



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN
FACULTAD DE BIOQUIMICA QUIMICA Y FARMACIA
Ayacucho 471 - T. E. 0054 381 4107215 - FAX 0054 381 4248169
T4000CAN – San Miguel de Tucumán – República Argentina



TRABAJO DE POSGRADO TITULADO:

**“MICROBIOTA NATIVA DEL TRACTO REPRODUCTOR BOVINO (TRB):
CARACTERIZACION DE CEPAS DE *Escherichia coli* PATOGÉNICAS Y SENSIBILIDAD
FRENTE A EXTRACTOS VEGETALES”**

TESISTA

Méd. Vet. Candelaria Gonzalez Moreno

DIRECTORA

Dra. María Claudia Otero

COMISION DE SUPERVISION:

Dra. María Lucila Saavedra

Dra. Silvana Andrea Apichela

Este trabajo fue realizado en la Facultad de Agronomía y Zootecnia de la Universidad Nacional de Tucumán (UNT) y en el Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO), dependiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y de la UNT.



Con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), y Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Tucumán (CIUNT).

Parte de los resultados de este trabajo de tesis doctoral se han difundido en las siguientes publicaciones y reuniones científicas:

➤ **Revistas científicas con referato**

- Gonzalez Moreno C, Fontana C, Cocconcelli PS, Callegari ML, Otero MC. (2016) Vaginal microbial communities from synchronized heifers and cows with reproductive disorders. J Appl Microbiol doi: 10.1111/jam.13239.

- Torres Luque A, Gonzalez Moreno C, Pasteris SE, Orden JA, de la Fuente R, Otero MC. (2017) Antimicrobial resistant *Escherichia coli* in the reproductive tract microbiota of cows and sows. Comp Immunol Microbiol Infect Dis doi: 10.1016/j.cimid.2017.09.002.

- Gonzalez Moreno C, Torres Luque A, Cisint JC, Otero MC. Genomic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates recovered from vagina of dairy cows. Manuscrito en preparación.

➤ **Reuniones científicas nacionales**

-“Susceptibilidad antimicrobiana y factores de virulencia de *Escherichia coli* nativas del tracto reproductor bovino (TRB) y porcino (TRP) de sistemas de cría del noroeste de Argentina”. Torres Luque A, Gonzalez Moreno C, Pasteris S.E, Orden JA, de la Fuente R, Otero MC. III Congreso de Bioquímicos del Litoral, XVI Jornadas Argentinas de Microbiología. 5 al 7 de Agosto de 2015.

-“Microbiota nativa del tracto reproductor bovino (TRB) en hembras con diferente performance reproductiva”. 3ra. Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina. San Miguel de Tucumán, Tucumán. Duración: 9- 11 de Septiembre de 2015.

-“*Escherichia coli* nativas del tracto reproductor bovino (TRB) y porcino (TRP): características asociadas a patogenicidad”. Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina. 9 al 11 de Septiembre de 2015, San Miguel de Tucumán, Tucumán.

-“Caracterización de *Escherichia coli* en vacas con trastornos reproductivos pertenecientes a tambos de la Cuenca Tapia-Trancas.” Jornadas de Jóvenes

Investigadores 2017. San Miguel de Tucumán, Tucumán. Duración: 28 y 29 de Junio de 2017.

-“Extractos vegetales activos frente a *Escherichia coli* asociadas a trastornos reproductivos (vtr) de vacas lecheras.” XXXIV Jornadas Científicas de la Asociación de Biología de Tucumán. Tafi del Valle, Tucumán. Duración 26 y 27 de Octubre de 2017.

-“Potencial patogénico de *Escherichia coli* nativas de vagina de vacas lecheras con trastornos reproductivos”. XXXV Jornadas Científicas de la Asociación de Biología de Tucumán. Tafi del Valle, Tucumán. Duración 25 y 26 de Octubre de 2018.



AGRADECIMIENTOS

Méd. Vet. Candelaria Gonzalez Moreno

AGRADECIMIENTOS

A la Mater, por ser quien ha estado a mi lado brindándome su amor en todo momento y fuerzas necesarias para concluir con esta etapa de mi vida. A Diego, por todo su amor y por impulsarme al transmitir el orgullo que sienten por mí, haciendo que hoy pueda cumplir esta gran meta en mi vida. A Guadalupe, por llenarme de alegría y amor. A mis padres, mil palabras no bastarían para agradecerles su apoyo, su comprensión y sus consejos a lo largo de mi vida. A mis hermanos y cuñados, por su apoyo incondicional.

A mi directora, Dra. María Claudia Otero, quién confió en mí para realizar este trabajo de tesis. Por estar siempre dispuesta a ayudarme cuando lo necesité, por guiarme, por su paciencia. Por ser una gran amiga y hasta a veces ser un poquito mamá.

A mi Comisión de Supervisión de tesis, Dra. Silvana Andrea Apichela y Dra. María Lucila Saavedra, por sus valiosos consejos en cada una de nuestras reuniones y en la corrección del manuscrito.

A las autoridades de la Facultad de Agronomía y Zootecnia de la UNT y del Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO), por la posibilidad de desarrollar mi tesis.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por las becas otorgadas para llevar a cabo mis estudios de posgrado y al Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Tucumán (CIUNT) por el financiamiento de este trabajo.

A la Universidad Nacional de Tucumán y a la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia por permitirme continuar educándome.

Al Méd. Vet. Domingo Viscido Cadario, por su cariño, por todos sus consejos y por prestarme su oído siempre que lo necesité y colaboración en la realización de la tesis.

Al Dr. Sergio E. Pasteris, por su cariño, por sus consejos, por toda su disposición y ayuda en la realización de la tesis.

Agradecimientos

Al Prof. Asoc. Ing. Zoot. Juan Carlos Cisint, al Dr. Rubén Oliszewski y todo el personal del Laboratorio de Calidad de Lácteos (LaCaLac), por toda la ayuda brindada en el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Rodrigo Carvalho Bicalho, por permitirme realizar una pasantía en su laboratorio en el Department of Population Medicine and Diagnostic Sciences, College of Veterinary Medicine, (Cornell University, EE.UU.).

A la Dra. Catherine Schouler del Institut National de la Resherche Agronomique (INRA, Francia) y la Dra. Noemí Sarsano del laboratorio de bacteriología del Hospital del Niño Jesús (San Miguel de Tucumán, Argentina) por facilitar cepas de *Escherichia coli* utilizadas como controles en este trabajo de tesis.

A la Dra. María Jose Rodriguez Vaquero, por su ayuda y buena predisposición.

A mis compañeros de laboratorio a los que estuvieron (Noelia, Lourdes y Emmanuel) y a los que están (Andrea, Virginia, Andreína, Constanza y Ezequiel) por hacerme parte de sus vidas y por compartir la mía.

A mi compañera y amiga Andrea, mi compañera de experimentos, por su infinita paciencia. Estoy muy feliz y agradecida de haber vivido esta etapa con vos como compañera.

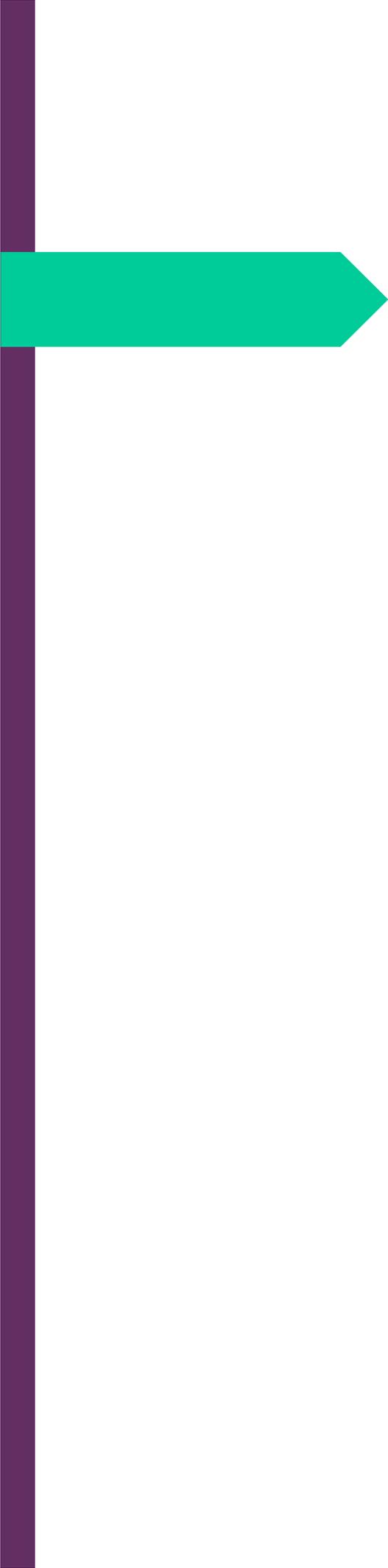
A Virginia, por siempre tener un mate rico listo, por tu cariño y solidaridad.

A Poly y Priscilla por siempre ayudarme cuando las necesité, por su amistad que tanto valoro.

A todos los becarios e investigadores del Instituto de Biología, gracias por los momentos compartidos en los pasillos y por colaboración en la realización de la tesis.

A los becarios del Instituto de Química Biológica, por su compañerismo y desinteresada colaboración.

Por último, quiero agradecer a todos los que de una forma u otra aportaron un granito de conocimiento y apoyo en la realización de esta tesis.



ÍNDICE

Méd. Vet. Candelaria Gonzalez Moreno

Índice

RESUMEN	1
GENERALIDADES	5
I. PRODUCCIÓN BOVINA	5
II. REPRODUCCIÓN BOVINA Y PRODUCTIVIDAD	6
III. INFECCIONES QUE AFECTAN EL TRACTO REPRODUCTOR BOVINO	8
IV. TERAPIAS CONVENCIONALES	14
V. TERAPIAS ALTERNATIVAS	16
HIPÓTESIS	19
OBJETIVOS GENERALES	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19

CAPÍTULO I: EVALUACIÓN DE LAS POBLACIONES MICROBIANAS DEL TRACTO REPRODUCTOR BOVINO (TRB) EN HEMBRAS CON DIFERENTE PERFIL CLÍNICO Y SISTEMAS PRODUCTIVOS

1. INTRODUCCIÓN	20
2. OBJETIVO ESPECÍFICO	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1. ANIMALES	24
3.1.1. CATEGORÍAS DE ANIMALES	24
3.1.2. PROTOCOLO DE SINCRONIZACIÓN DE OVULACIÓN	25
3.2. EVALUACIÓN CLÍNICA	26
3.3. TOMA DE MUESTRAS	26
3.4. EVALUACIÓN CITOLÓGICA	27
3.5. EVALUACIÓN MICROLÓGICA	28
3.5.1. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	28
3.5.2. ESTUDIOS MICROBIOLÓGICOS INDEPENDIENTES DE CULTIVO	29

3.5.2.1. EXTRACCIÓN DEL ADN TOTAL DE LAS MUESTRAS VAGINALES	29
3.5.2.2. AMPLIFICACIÓN DEL GEN 16S ARNr Y ELECTROFORESIS EN GEL CON GRADIENTE DESNATURALIZANTE (DGGE)	30
3.5.2.3. SECUENCIACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN	31
3.5.2.4. ANÁLISIS DE CLUSTERES	31
3.5.2.5. AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN 16S ARNr. ENSAYO METAGÉNICO	32
3.5.2.6. SECUENCIACIÓN Y BIOINFORMÁTICA	33
3.5.3. ESTUDIOS MICROBIOLÓGICOS DEPENDIENTES DE CULTIVO	34
4. RESULTADOS	36
<i>COMUNIDADES MICROBIANAS DEL TRACTO REPRODUCTOR EN GANADO DE CARNE: EFECTO DE UN PROTOCOLO DE SINCRONIZACIÓN DE OVULACIÓN EN VAQUILLONAS SANAS</i>	
4.1. ENSAYO 1: POBLACIONES BACTERIANAS DEL ECOSISTEMA VAGINAL Y PERFIL CITOLÓGICO EN VAQUILLONAS DE CARNE SINCRONIZADAS CON PRID.	36
4.1.1 ESTUDIOS DEPENDIENTES DE CULTIVO	36
4.1.2 ESTUDIOS INDEPENDIENTES DE CULTIVO: ELECTROFORESIS EN GEL CON GRADIENTE DESNATURALIZANTE (DGGE)	38
4.1.3 ESTUDIOS INDEPENDIENTES DE CULTIVO: ANÁLISIS METAGÉNICO DE LA COMUNIDAD BACTERIANA VAGINAL EN VAQUILLONAS SINCRONIZADAS	42
4.1.3-A COMPARACIONES A NIVEL DE <i>PHYLUM</i>	44
4.1.3-B COMPARACIONES SEGÚN EL MENOR NIVEL TAXONÓMICO ASIGNADO	45
<i>COMUNIDADES MICROBIANAS DEL TRACTO REPRODUCTOR EN GANADO DE TAMBO: VACAS CON TRASTORNOS REPRODUCTIVOS Y VAQUILLONAS SANAS</i>	

4.2. ENSAYO 2: POBLACIONES BACTERIANAS DEL ECOSISTEMA VAGINAL EN VAQUILLONAS SANAS, VACAS CON METRITIS Y CON SÍNDROME DE VACA REPETIDORA	48
4.2.1 ANÁLISIS METAGÉNICO DE LA COMUNIDADES BACTERIANAS VAGINALES	48
4.2.1-A COMPARACIONES A NIVEL DE <i>PHYLUM</i>	50
4.2.1-B COMPARACIONES SEGÚN EL MENOR NIVEL TAXONÓMICO ASIGNADO	51
5. DISCUSIÓN	53
6. CONCLUSIONES PARCIALES	63

CAPÍTULO 2: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE *Escherichia coli* AUTÓCTONAS DE HEMBRAS BOVINAS CON DIFERENTES CONDICIONES CLÍNICO-REPRODUCTIVAS

1. INTRODUCCIÓN	64
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	71
3. MATERIALES Y MÉTODOS	72
3.1. EVALUACIÓN CLÍNICA	72
3.2. TOMA DE MUESTRAS	72
3.3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	72
3.4. ANIMALES	72
3.5. AISLAMIENTO DE <i>Escherichia coli</i>	72
3.5.1. CONDICIONES DE CULTIVO Y CONSERVACIÓN	72
3.5.2. EXTRACCIÓN DE ADN	73
3.6. IDENTIFICACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> .	73
3.6.1. PRUEBAS BIOQUÍMICAS	73
3.6.2. DETECCIÓN DEL GEN DE β -D-glucuronidasa	74
3.7. EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE LOS AISLADOS DE <i>Escherichia coli</i>	75
3.8. PERFIL FILOGENÉTICO	76

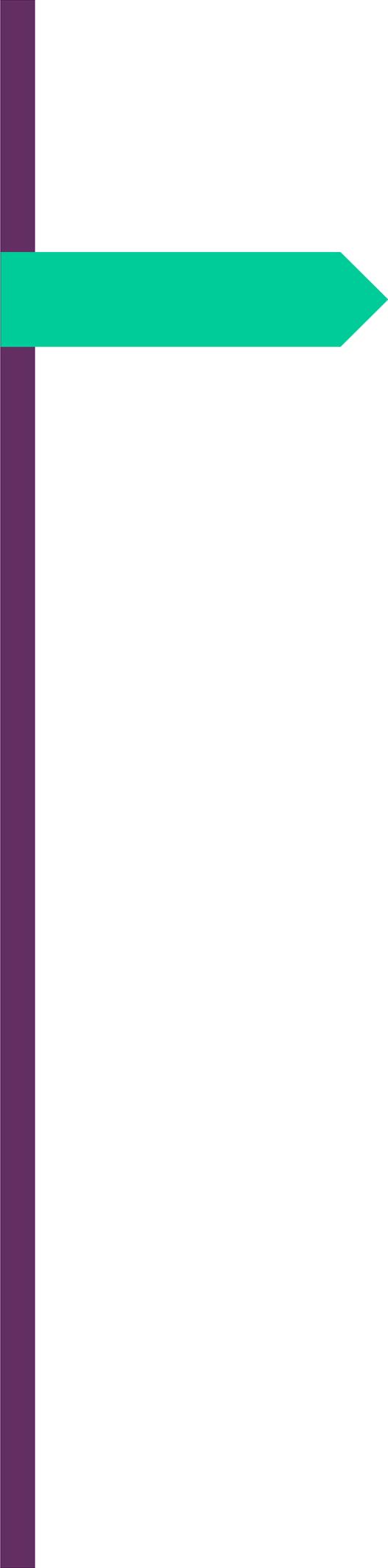
**CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL DE PATOGENICIDAD DE AISLADOS DE
Escherichia coli VAGINALES BOVINAS**

3.9. ETAPA 1: EVALUCIÓN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y PRESENCIA DE FACTORES DE VIRULENCIA ASOCIADOS A <i>Escherichia coli</i> ENTEROPATÓGENA	79
3.9.1. MICROORGANISMOS EVALUADOS	79
3.9.2. MICROORGANISMOS DE REFERENCIA	79
3.9.3. SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS	79
3.9.4. PRESENCIA DE GENES ASOCIADOS A FACTORES DE VIRULENCIA DE <i>Escherichia coli</i> ENTEROPATÓGENICAS	81
3.10. ETAPA 2: EVALUACIÓN DE GENES ASOCIADOS A FACTORES DE VIRULENCIA DE <i>Escherichia coli</i> EXTRA- INTESTINALES	81
3.10.1. MICROORGANISMOS EVALUADOS	81
3.10.2. MICROORGANISMOS DE REFERENCIA	82
3.10.3. PRESENCIA DE GENES ASOCIADOS A FACTORES DE VIRULENCIA DE <i>Escherichia coli</i> EXTRA-INTESTINALES	82
3.11. ETAPA 3: EXPRESIÓN DE PROPIEDADES ASOCIADAS A PATOGENICIDAD EN <i>Escherichia coli</i>	83
3.11.1. α -HEMÓLISIS	83
3.11.2. FACTORES ASOCIADOS A ADHESIÓN Y COLONIZACIÓN	83
a- MOVILIDAD	83
b- EXPRESIÓN DE FIMBRIA FIMBRIA CURLY Y/O CELULOSA	84
c- FORMACIÓN DE BIOFILM	86
d- PRESENCIA DE FIMBRIA P Y PILI TIPO I	87
3.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	88
4. RESULTADOS	90
4.1. ANIMALES CON CULTIVOS POSITVOS PARA <i>Escherichia coli</i>	90
4.2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> NATIVAS DEL TRB	90

4.3. EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE LOS AISLADOS DE <i>Escherichia coli</i>	100
4.4. CONFORMACIÓN FILOGENÉTICA	102
CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL DE PATOGENICIDAD DE LOS AISLADOS DE <i>Escherichia coli</i> VAGINALES BOVINAS	
4.5. ETAPA 1: RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y PRESENCIA DE FACTORES DE VIRULENCIA ASOCIADOS A <i>Escherichia coli</i> ENTEROPATÓGENA	105
4.5.1. RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS	105
4.5.2. PRESENCIA DE GENES ASOCIADOS A FACTORES DE VIRULENCIA DE <i>Escherichia coli</i> ENTEROPATÓGENICAS	107
4.6. ETAPA 2: EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE GENES ASOCIADOS A FACTORES DE VIRULENCIA DE <i>Escherichia coli</i> EXTRA-INTESTINALES	108
4.7. ETAPA 3: EXPRESIÓN DE PROPIEDADES ASOCIADAS A PATOGENICIDAD EN <i>Escherichia coli</i>	113
4.7.1. α -HEMÓLISIS	113
4.7.2. FACTORES ASOCIADOS A ADHESIÓN Y COLONIZACIÓN	114
a-. MOVILIDAD	114
b- EXPRESIÓN DE FIMBRIA CURLY	115
c- FORMACIÓN DE BIOFILM	115
d- EXPRESIÓN DE FIMBRIA TIPO 1 Y P	119
5. DISCUSIÓN	121
6. CONCLUSIONES PARCIALES	130
CAPÍTULO 3: SELECCIÓN DE EXTRACTOS DE ORIGEN VEGETAL CON ACTIVIDAD INHIBITORIA SOBRE <i>Escherichia coli</i> PATOGENICAS NATIVAS DEL TRACTO REPRODUCTOR BOVINO (TRB).	
1. INTRODUCCIÓN	131
2. OBJETIVO ESPECÍFICO	135

3. MATERIALES Y MÉTODOS	136
3.1. EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>Escherichia coli</i> POTENCIALMENTE PATOGÉNICAS DE EXTRACTOS VEGETALES	136
3.1.1. EXTRACTOS VEGETALES	136
3.1.2. ESPECIFICACIONES DE CALIDAD DE LOS EXTRACTOS VEGETALES UTILIZADOS	137
3.1.3. MICROORGANISMOS	138
3.1.4. CONDICIONES DE CRECIMIENTO Y CONSERVACIÓN	138
3.1.5. PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO	138
3.1.6. ESTANDARIZACIÓN DEL INÓCULO BACTERIANO	139
3.1.7. SIEMBRA, CONDICIONES DE INCUBACIÓN Y LECTURA	139
3.2. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE <i>Escherichia coli</i> CON POTENCIAL PATOGÉNICO A ANTIBIOTICOS EN PRESENCIA DE EXTRACTOS VEGETALES	140
3.2.1. EXTRACTOS VEGETALES, ANTIBIÓTICOS Y MICROORGANISMOS EVALUADOS	141
3.2.2. CONDICIONES DE CRECIMIENTO	142
3.2.3. SIEMBRA, CONDICIONES DE INCUBACIÓN Y LECTURA	143
3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	143
4. RESULTADOS	144
4.1. EFECTO DE EXTRACTOS VEGETALES ESTANDARIZADOS SOBRE <i>Escherichia coli</i> CON POTENCIAL PATOGÉNICO	144
4.2. SENSIBILIDAD DE <i>Escherichia coli</i> CON POTENCIAL PATOGÉNICO A ANTIBIOTICOS EN PRESENCIA DE EXTRACTOS VEGETALES	147
5. DISCUSIÓN	150
6. CONCLUSIONES PARCIALES	154
CONCLUSIONES GENERALES	155
PROYECCIONES	157

ABREVIATURAS	158
BIBLIOGRAFÍA	162
ANEXO	178



RESUMEN

Méd. Vet. Candelaria Gonzalez Moreno

RESUMEN

La eficiencia en producción bovina de carne y leche depende de la performance reproductiva de los vientres, siendo afectada por infecciones del tracto reproductor. Aunque *Escherichia coli* forma parte de la microbiota nativa vaginal bovina, se reconoce a este microorganismo como partícipe necesario de dichas infecciones. Sin embargo, al inicio de este trabajo, no se habían descrito cuales modificaciones de esta microbiota predisponen a dichas infecciones, como tampoco, cuales características de *E. coli* determinan su capacidad patogénica en este tracto.

En el presente trabajo mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo, se puso en evidencia que la conformación de la microbiota vaginal depende del perfil reproductivo y del manejo animal. Patrones poblacionales particulares, obtenidos por PCR-DGGE y metagénica, se asociaron a: vaquillonas de carne sincronizadas (para inseminación artificial a tiempo fijo); vaquillonas y vacas de tambo, presentando estas últimas trastornos reproductivos (VTR) (enfermedad uterina posparto, EUP y síndrome de vaca repetidora de celo, SVRC). Los *phylum* bacterianos Fusobacteria y Bacteroidetes presentaron significativamente mayor abundancia relativa en el grupo EUP mientras que Proteobacteria lo fue en SVRC. En vaquillonas de carne sincronizadas se observó aumento significativo de la abundancia relativa de Tenericutes y Fusobacteria en el día de ovulación.

Se describe por primera vez, la conformación filogenética, resistencia antimicrobiana y presencia de genes asociados a virulencia (FV) en poblaciones de *E. coli* vaginales nativas de animales de tambo: vaquillonas vírgenes, vacas con EUP y SVRC. Se identificaron 97 aislados de *E. coli* y se evaluó la variabilidad genética y conformación filogenética asociándolas con el grupo animal de origen; destacándose la asociación significativa entre SVRC y el filogrupo B1. Se detectó elevada prevalencia de resistencia, particularmente en aislados de VTR. La presencia de genes asociados a FV intestinales fue muy baja, probablemente, por una especificidad en el nicho. Sin embargo, la expresión y presencia de genes de FV relacionados a *E. coli* extra-intestinales mostró asociación con los perfiles reproductivos y se concluye que la EUP se asocia significativamente con mayor movilidad y presencia de *fyuA*,

mientras que VTR se relaciona de manera significativa con formación de Biofilm y el gen *csgA*.

La sensibilidad de *E. coli* con mayor potencial patogénico fue evaluada frente a extractos hidro-alcohólicos de origen vegetal. Así, los extractos de *Aloe Barberensis miller*, *Salvia officinalis*, *Genciana Lutea*, *Malva Sylvestris* y *Matricaria chamomilla L* evidenciaron la mejor actividad bacteriostática, mientras que la mayor acción bactericida se observó con *Matricaria chamomilla L* y *Ruscus Aesculeatus* sobre *E. coli* asociados a SVRC. Se demostró *in vitro* el sinergismo de extractos vegetales y antimicrobianos sobre *E. coli* resistentes, asociadas a VTR. Extractos de *Salvia officinalis* y *Genciana Lutea* aumentaron la sensibilidad a ciprofloxacina y amoxicilina, mientras que *Matricaria chamomilla L* y *Aloysia triphylla* lo hicieron para estreptomycinina.

Estos resultados sientan bases para el diseño de estrategias destinadas a monitorear y controlar la colonización de *E. coli* con potencial patogénico que representan riesgo para la sanidad del tracto reproductor bovino y por lo tanto, la fertilidad. Un recurso biotecnológico de esta naturaleza accionaría positivamente en la salud reproductiva de vacas y vaquillonas.

PALABRAS CLAVE: microbioma vaginal, reproducción bovina, *Escherichia coli*, extractos vegetales.

ABSTRACT

In both beef and dairy industries, productive efficiency depends on the reproductive performance and can be affected by reproductive tract infections. Even though *Escherichia coli* is part of the native vaginal microbiota, this microorganism is recognized as a necessary participant of the infections previously mentioned. However, until the beginning of this work, it has not been described which modifications of this microbiota may predispose to these infections nor there was consensus on the characteristics related to the pathogenic capacity of *E. coli* in this tract.

In the present work, both dependent and independent culture techniques were used and the results showed that the conformation of the vaginal microbiota depended on the reproductive profile and management of the animals. Specific population patterns, obtained by PCR-DGGE and metagenic analysis, were associated to: synchronized beef heifers (for fixed time artificial insemination); heifers and dairy cows, these last presenting reproductive disorders (CRD) (postpartum uterine disease, PUD and repeater breeder syndrome, RBS). Fusobacteria and Bacteroidetes *phyla* showed significantly greater relative abundance in the PUD group and Proteobacteria, in the RBS group. In beef synchronized heifers a significant increase in the relative abundance of Tenericutes and Fusobacteria was observed on the ovulation day.

This thesis describes, for the first time, the phylogenetic conformation, antimicrobial resistance and presence of genes associated with virulence (VF) in native *E. coli* populations of dairy animals: virgin heifers and cows with PUD and RBS. 97 *E. coli* were isolated and identified followed by the evaluation of their genetic variability and phylogenetic conformation by associating them with the animal group they were from of origin; highlighting the significant association between RBS and phylogenetic group B1. A high prevalence of resistance was detected, particularly in CRD isolates. The presence of genes associated with intestinal VF was very low, probably due to specificity in the niche. However, the expression and presence of VF genes related to extra-intestinal *E. coli* showed association with the reproductive

profiles: PUD was significantly associated with bacterial motility and *fyuA*, while CRD was significantly related to Biofilm formation and the *csgA* gene.

The sensitivity of *E. coli* with greater pathogenic potential was evaluated against hydro-alcoholic plant extracts. Thus, the extracts of *Aloe Barberensis miller*, *Salvia officinalis*, *Gentiana Lutea*, *Malva Sylvestris* and *Matricaria chamomilla L* showed the best bacteriostatic activity, while the highest bactericidal action was observed by *Matricaria chamomilla L* and *Ruscus Aesculeatus* on *E. coli* associated with RBS. The synergism of plant extracts and antimicrobials on resistant *E. coli* associated with CRD was demonstrated *in vitro*. Extracts of *Salvia officinalis* and *Gentiana Lutea* increased the sensitivity to ciprofloxacin and amoxicillin, while *Matricaria chamomilla L* and *Aloysia triphylla* had similar effect when combined with streptomycin.

These results provide the basis for the design of strategies for monitoring and control the colonization of *E. coli* with pathogenic potential, that represent a risk for the health of the bovine reproductive tract and, therefore, fertility. A biotechnological resource of this nature would influence the reproductive health of cows and heifers.

KEY WORDS: vaginal microbiome, bovine reproduction, *Escherichia coli*, plant extracts.



GENERALIDADES

Méd. Vet. Candelaria Gonzalez Moreno

I. PRODUCCIÓN BOVINA

El ganado bovino es considerado el pilar fundamental de la producción pecuaria en todas o casi todas las áreas del mundo, gracias a las peculiaridades del tubo digestivo de estos rumiantes que les permiten transformar las materias vegetales en proteínas de alto valor biológico (Zambrano, 2006).

La producción de carne y de leche constituye una de las actividades más relevantes del sector agroalimentario argentino y es de enorme importancia en la vida económica y social de nuestro país, es así que la actividad agropecuaria representó el 7% del PBI total (según datos del INDEC de 2017). Además, Argentina ocupa el segundo lugar como productor de carne bovina en el Mercosur, y en la actualidad es el segundo consumidor de carne per cápita en la región. Según el Informe Económico Mensual de febrero de 2018, elaborado por la Cámara de la Industria y Comercio de Carnes y Derivados de la República Argentina (CICCRA), nuestro país cuenta con un fuerte mercado interno ya que consume el 88,5% de la producción (Revista Supercampo, 2018). El mencionado informe revela que el excedente es exportado a los mercados más exigentes, siendo la carne argentina de reconocida calidad en el mundo (Ponti, 2011).

A lo largo de los años, la ganadería bovina en Argentina ha tenido que sortear una serie de obstáculos que minaron su crecimiento y desarrollo; además compite con la agricultura por un recurso vital y escaso como es el suelo (Barbera y col., 2003). En este contexto, la producción ganadera perdió rentabilidad frente a la de oleaginosas, ya que mayores superficies de la región pampeana se han destinado a la actividad agrícola. Como consecuencia de esta situación, el rodeo nacional sufrió una drástica reducción y fue desplazado hacia el NOA y NEA y estuvo acompañado de pérdidas en los índices de preñez. Datos provistos por el SENASA (www.senasa.gob.ar) estimaron que a fines del año 2018 el stock de ganado fue de 54 millones de cabezas, 1,25 millones de cabezas menos de lo previsto, como resultado de una menor zafra de terneros y un aumento de la faena, producto de las inclemencias climáticas.

La lechería nacional constituye una de las actividades productivas más importantes de la cadena agroalimentaria, que en la última década del S. XX recobró su dinamismo tecnológico y productivo. De esta manera comenzó un proceso de

articulación con el mercado global que, con altibajos, se mantiene en la actualidad con una participación en las exportaciones que ha oscilado entre el 15 y 28% de la producción total, según lo analizado por el Observatorio de la Cadena Láctea Argentina y la Fundación para la Promoción y Desarrollo de la Cadena Láctea Argentina. Sin embargo, el sector ha entrado en un proceso de estancamiento que lleva aproximadamente 20 años, donde los niveles productivos del año 2017 son los mismos que los del período 1998-1999. A esto debe agregarse una gran variación interanual de la producción, causada en gran parte por factores de índole climáticos. Así, en el período transcurrido entre 1998 y 2017 la producción aumentó sólo un 3,2% (Galletto, 2018).

La producción de leche en Argentina está concentrada mayoritariamente en las provincias de Córdoba (37%), Santa Fe (32%) y Buenos Aires (25%), y en menor medida en Entre Ríos (3%), Santiago del Estero (1%) y La Pampa (1%), a lo que suma una participación más reducida de al menos 13 cuencas lecheras extra-pampeanas (Sanchez y col., 2012). Entre ellas, la cuenca Tapia-Trancas que se encuentra ubicada en la región centro-norte de la Provincia de Tucumán. Esta cuenca consta de 44 tambos, los cuales logran en conjunto una producción diaria de leche aproximada de 70 mil litros (Seidán, 2018). Si bien a nivel nacional representa el 0,3% de la producción total, a nivel regional y local es muy importante porque genera mano de obra, tanto directa como indirecta.

II. REPRODUCCIÓN BOVINA Y PRODUCTIVIDAD

La producción deficiente en el rodeo constituye la causa más importante de pérdidas en el orden productivo y económico, por lo que es necesario establecer pautas adecuadas para el manejo de la alimentación, reproducción y sanidad. Si la eficiencia reproductiva del ganado en explotación es baja, será más difícil alcanzar rentabilidad de la misma, obteniéndose como resultado menor cantidad de terneros, escasa disponibilidad de hembras jóvenes para la reposición, menor producción de leche, mayores requerimientos de servicios veterinarios e inseminaciones improductivas. Estos problemas incrementan los costos de la producción (Vega, 2004).

El conocimiento de los indicadores, índices y parámetros reproductivos, así como su análisis, interpretación y evaluación determinarán la toma de decisiones. Estas acciones tienen, cada día, mayor importancia en el destino de las explotaciones lecheras y productoras de carne, debido a la gran correlación existente entre los índices reproductivos y los resultados económicos finales de la explotación (Vega, 2004).

La situación antes descrita exige incrementar los parámetros reproductivos. La producción en rodeos lecheros requiere una gran intensificación, con exigencias metabólicas sobre las hembras que comprometen la reproducción (Skenandore y col., 2017). El objetivo reproductivo en la actividad lechera es obtener un ternero por vaca y por año, lo que significa que las vacas deben quedar preñadas después del servicio, mantener la gestación, tener un parto después de 270 días aproximadamente y esperar un período de 40-50 días para ser servidas nuevamente. Sin embargo, esto no siempre se logra y se requiere de varios servicios consecutivos para obtener la preñez (Pérez-Marín y col., 2012).

En contraste con las vacas lecheras, en el ganado de carne es necesario obtener un intervalo entre partos de 365 días y una tasa general de parto del 95% para alcanzar una alta eficiencia reproductiva, (Duffy y col., 2004; Ferreira y col., 2018). Para ello, la vaca debe preñarse alrededor del día 85 después del parto. El servicio natural varía entre 45 y 90 días, incluso puede durar hasta 6 meses o también puede ser permanente, dependiendo del manejo reproductivo. Un estudio realizado en nuestro país indica que, en promedio, el 75-85% de las vacas alcanzan este objetivo (Hidalgo y col., 2011). El establecimiento de una temporada de reproducción definida (3 a 4 meses de actividad reproductiva) permite la concentración temporal de la concepción, los partos y el destete, lo que facilita el manejo general de los rodeos de carne. Además, las vacas que se preñan en los primeros 2 meses de la temporada de servicio estacionado son las hembras más productivas y deseadas ya que tienen tiempo adicional para recuperarse antes de la próxima temporada reproductiva, lo que mejora la probabilidad de una nueva preñez (Rhodes y col., 2003).

En consecuencia, el **rendimiento reproductivo** es un parámetro que influye en la eficiencia productiva de todos los rodeos bovinos, ya que es un requisito para mantener la sostenibilidad económica de dichas explotaciones (Ricci y col., 2017). En

este sentido, con el objetivo de recuperar y aumentar el stock ganadero, se están implementando diferentes políticas a nivel nacional. Esta premisa no sólo se exige para la ganadería destinada a la producción de carne sino también en el tambo, ya que la preñez renueva la lactancia promoviendo una mayor producción de leche y permitiendo disponer de un adecuado stock de terneras para reposición.

Las causas multifactoriales de la baja eficiencia reproductiva incluyen deficiencias nutricionales, manejo reproductivo ineficiente y balance energético negativo durante el posparto, que puede tener una influencia perjudicial sobre el sistema inmunológico, ocasionando una mayor susceptibilidad frente a la invasión de microorganismos patógenos (Ricci y col., 2017). De esta manera, las afecciones uterinas que afectan a las vacas en el posparto se consideran entre las causas más importantes de ineficiencia reproductiva y han sido ampliamente descritas, tanto en rodeo lechero (Gilbert y col., 2005; LeBlanc 2008; Bicalho y col., 2017b) como en rodeo de carne (Santos y col., 2009; Ricci y col., 2015). Por lo tanto, para mantener los índices de reproducción en niveles competitivos es preciso preservar el estado sanitario del tracto reproductor bovino en aquellos momentos críticos del manejo de la hembra, como ser: inseminación, preparto, parto y posparto.

III. INFECCIONES QUE AFECTAN EL TRACTO REPRODUCTOR BOVINO (TRB)

La mayoría de las condiciones inflamatorias posparto del útero comienzan con la contaminación bacteriana de la luz uterina. Sin embargo, es necesario diferenciar la contaminación uterina de la infección (Sheldon y col., 2006). El útero de las vacas posparto generalmente está contaminado con una variedad de bacterias, pero esto no necesariamente se asocia con enfermedad clínica. La infección implica la adhesión de microorganismos patógenos a la mucosa, la colonización o invasión del epitelio y/o la liberación de toxinas bacterianas que conducen al establecimiento de la enfermedad uterina (Sheldon y col., 2006). Asimismo, el desarrollo de la enfermedad depende de la respuesta inmune de la vaca, así como de la especie y el número de bacterias que accedieron al útero. La intensidad de la colonización del útero de las vacas posparto por bacterias patógenas puede ser lo suficientemente grande como para superar los

mecanismos de defensa uterinos y causar infecciones potencialmente mortales, aunque éstas son relativamente poco frecuentes (Sheldon & Dobson, 2004). De hecho, las infecciones uterinas que no son potencialmente mortales son las más comunes y se asocian con un rendimiento reproductivo deficiente. El establecimiento de una infección uterina de origen bacteriano puede ser favorecido en parte por el sistema endocrino. Particularmente la progesterona parece suprimir las defensas inmunitarias uterinas. Así, la formación del primer cuerpo lúteo después del parto y la concomitante secreción de progesterona a menudo precede al inicio de la enfermedad uterina (Skenandore y col., 2017).

Las enfermedades uterinas posparto, como el síndrome de vaca repetidora de celo, la metritis puerperal y la endometritis clínica y subclínica son importantes tanto por razones económicas ya que afectan profundamente el rendimiento reproductivo, como por razones de bienestar animal porque contribuyen al estrés de la hembra y a la subsecuente eliminación de la vaca del rodeo tanto en el ganado de carne como de leche (Pérez-Marín & España., 2007; Bicalho y col, 2010; Ricci y col., 2017).

El correcto diagnóstico de la presencia de infección uterina es de gran importancia para facilitar el tratamiento oportuno y apropiado y cuantificar la gravedad de la enfermedad, lo que permite dar un pronóstico para la fertilidad futura del animal. Sobre la base de hallazgos histopatológicos y clínicos, Sheldon y col. (2006) clasificaron las enfermedades uterinas en el posparto temprano. Esta categorización ha sido utilizada como referencia por diversas publicaciones posteriores (Santos & Bicalho, 2012; Jeon y col., 2016, 2017, 2018; Bicalho y col., 2017a,b).

La **metritis puerperal** es una enfermedad sistémica aguda debida a una infección del útero, generalmente dentro de los 21 días posteriores al parto. Esta enfermedad se caracteriza por los siguientes signos clínicos: secreción uterina acuosa de color marrón rojizo y, por lo general, pirexia; en casos severos también puede haber una disminución en la producción de leche, depresión, anorexia, taquicardia y deshidratación (Sheldon y col., 2006). La metritis puerperal a menudo se asocia con retención de placenta, distocia, muerte fetal o parto gemelar, y generalmente ocurre hacia el final de la primera semana después del parto, siendo poco frecuente después de la segunda semana (Drillich y col., 2001). El diagnóstico de metritis puerperal se

realiza sobre la base de los signos clínicos de la enfermedad y la descarga uterina acuosa, fétida y de color amarronado (Sheldon y col., 2006).

El término **metritis clínica** se debe utilizar en los cuadros en los que las vacas presentan retraso en la involución uterina y una secreción purulenta detectable en la vagina, en ausencia de fiebre dentro de los 21 días posteriores al parto (Sheldon y col., 2006). De hecho, en algunos casos de infección bacteriana grave no se detectó pirexia, incluso con un control diario de la temperatura (Sheldon y col., 2004a).

La **endometritis clínica** se caracteriza por la presencia de exudado uterino purulento (> 50% de pus) o mucopurulento (aproximadamente 50% de pus, 50% de moco) en vagina, 21 días o más después del parto, y no se acompaña de signos sistémicos (Sheldon y col., 2006). Este criterio de diagnóstico se ha validado mediante el examen de factores asociados con un aumento del intervalo parto-concepción en vacas lecheras posparto (LeBlanc y col., 2002).

La **endometritis subclínica** puede definirse como la inflamación endometrial. Es generalmente determinada por citología y no se detecta material purulento en la vagina (Sheldon y col., 2006). Así, en animales sin signos de endometritis clínica, la enfermedad subclínica se diagnosticó mediante la medición de la proporción de neutrófilos presentes en una muestra recolectada ya sea mediante el lavado de la luz uterina o bien utilizando un *cytobrush* (Gilbert, 2004; Kasimanickam y col., 2004, 2005). En base a estos resultados, Sheldon y col. (2006) propusieron definir al proceso inflamatorio como endometritis subclínica cuando el recuento de neutrófilos, determinado por citología exfoliativa, en muestras uterinas recolectadas 21-33 días posparto, supera el 18%; o bien cuando el recuento de neutrófilos es >10% a los 34-47 días, en ausencia de endometritis clínica.

La **piómetra** se caracteriza por la acumulación de material purulento o mucopurulento en la luz uterina y la distensión del útero, en presencia de un cuerpo lúteo activo; a menudo se registra un incremento de bacterias patógenas dentro de la luz uterina (Sheldon y col., 2006). Se ha postulado que la progesterona, durante el posparto, es la responsable de mantener el cierre funcional del cuello uterino; además, se asocia con el aumento de la susceptibilidad a la infección persistente (Sheldon y col., 2006). Si bien hay un cierre funcional del cuello uterino, el lumen no siempre está

completamente ocluido y algo de pus puede descargarse a través del cuello uterino hacia el lumen vaginal. Ecográficamente se caracteriza por la presencia de un cuerpo lúteo en un ovario, la acumulación de líquido de densidad ecográfica mixta en la luz uterina y la distensión del útero. La piómetra está asociada con la actividad de ese cuerpo lúteo, ya que se ha sugerido que la secreción de progesterona puede transformar la endometritis en piómetra (Kennedy & Miller, 1993). Otros autores han propuesto que la ovulación precoz después del parto y la formación de un cuerpo lúteo activo pueden predisponer a esta enfermedad uterina (Sheldon y col., 2006); este cuadro, a su vez, se asocia con fracaso de la luteólisis que podría ocasionar retención de ese cuerpo lúteo.

En los últimos años, el enfoque principal ha estado centrado en las enfermedades del útero y sus efectos sobre el rendimiento reproductivo (Sheldon y col., 2006; Ricci y col., 2015; Jeon y col., 2016, 2017, 2018; Bicalho y col., 2017b). Por lo tanto, la investigación básica sobre las enfermedades endometriales posparto está muy avanzada. Sin embargo, poco se ha estudiado acerca del rol de la mucosa vaginal, la cual representa la barrera anatómica-funcional entre el exterior y el cuello del útero y alberga una microbiota autóctona que presenta una dinámica característica a lo largo de la vida de la hembra (Otero y col., 2000). Así, es escasa la literatura acerca de la inflamación o la contaminación bacteriana de la vagina y la posterior influencia en la reproducción bovina. Sin embargo, se reconoce a la **vaginitis** o vulvovaginitis como un proceso inflamatorio, generalmente infeccioso, que puede extenderse y ascender en el tracto reproductivo en vacas susceptibles. Se han definido diferentes cuadros de vaginitis según la lesión observada y los patógenos asociados. La **vaginitis necrótica** que aparece en forma de brote se caracteriza por la presencia de lesión granulomatosa y necrótica grave centrada en la comisura ventral de la vulva. Se asocia con varios patógenos, posiblemente actuando de forma sinérgica, en particular *Porphyromonas levii* que representa un patógeno emergente de importancia veterinaria (Elad y col., 2004). Gilbert (2018) ha asociado este cuadro con los partos distócicos, caracterizándose por xifosis, cola elevada, anorexia, disuria, inflamación vulvar y perivulvar, así como por la presencia de descarga fétida y serosa, dentro del primer a cuarto día posparto y puede persistir durante 2 a 4 semanas. Las posibles

consecuencias de la vaginitis necrótica incluyen estenosis permanente de vagina, adherencias transvaginales o absceso peri-vaginal.

La **vulvovaginitis granular**, también llamada enfermedad granular venérea, está asociada a la infección por *Ureaplasma diversum* y se caracteriza por hiperemia y cambios granulares en los epitelios vulvar y vaginal, hiperplasia de los nódulos linfoides de la mucosa vestibular y secreción vaginal purulenta. Las alteraciones detectadas no constituyen una enfermedad específica, pero reflejan irritación de la mucosa vestibular (Azevedo y col., 2017). También se ha asociado con diferentes manifestaciones clínicas en el TRB que incluyen vulvitis granular, endometritis, salpingitis, aborto, infertilidad y pérdida de embriones (Argue y col., 2013).

La **vulvovaginitis pustular infecciosa** es causada por el *herpesvirus 1* y se transmite por servicio natural, contacto nasogenital o mecánicamente por insectos como las moscas. Las vacas afectadas muestran signos de lesión vaginal (cola levantada, micción frecuente) y tienen numerosas lesiones redondeadas y blancas en la mucosa vestibular. En poco tiempo, estas lesiones progresan a pústulas, erosiones o úlceras. La descarga mucopurulenta puede ser prominente. El ingreso intrauterino del virus produce endometritis necrotizante y cervicitis (Preziuso y col., 2018).

Cuadros subclínicos asociados a fallas en la fertilidad: Síndrome de Vaca Repetidora de celo (SVR)

El “**Síndrome de Vaca Repetidora de celo**” (SVR) o “Vaca Vacía” constituye un cuadro subclínico que causa importantes pérdidas de la fertilidad. La vaca vacía generalmente es definida como una vaca con genitales aparentemente sanos, sin infecciones clínicas aparentes, que no puede concebir después de tres o más servicios pero exhibe ciclos estrales normales (Pérez-Marín & España, 2007; Kumar & Singh, 2009). En el SVR, la infección bacteriana subclínica puede inducir una falla en la fecundación debido a la presencia de exudados inflamatorios capaces de causar el bloqueo de los oviductos o la muerte de espermatozoides (antes de llegar al sitio de fecundación) por la acción de toxinas bacterianas y reacción inflamatoria (Bhat y col., 2014). También se ha reportado que en este síndrome puede estar alterado el ambiente uterino, por inflamación del endometrio, denudación de su mucosa y cambios en sus

secreciones seguido de muerte embrionaria (Bhat y col., 2014). En los rodeos lecheros, el SVR aparece en el contexto de un sistema productivo intensificado que, como se ha mencionado previamente, impacta negativamente en la performance reproductiva. Así, el SVR puede afectar la delicada interacción del comportamiento estral, los patrones hormonales y la dinámica ovárica que, en sincronía con las funciones uterinas finalmente, determina el resultado del apareamiento o de la inseminación artificial (IA) (Pérez-Marín & España, 2007). Teniendo en cuenta las grandes demandas en la producción de vacas lecheras (que idealmente requiere obtener un ternero/vaca/año), el SVR tiene un impacto importante en la economía de los tambos. En el ganado de carne, las vacas se consideran repetidoras cuando no quedan preñadas después de haber estado expuestas a toros durante la temporada de servicio estacionado. Existe poca información sobre el SVR en el ganado de carne (Ferreira y col., 2008); sin embargo este síndrome debe ser estudiado con mayor profundidad en este tipo de explotaciones, ya que los costos pueden aumentar debido a la disminución del número de terneros por temporada y/o un aumento en la duración de la temporada reproductiva. Si las vacas de carne se aparean durante un largo tiempo (durante una temporada larga), se obtendrá una producción baja: los terneros serán menos pesados y su precio será menor, la gestión de la salud de terneros de diferentes edades será más difícil, habrá menor cantidad de terneras para reposición y el intervalo de parto será más largo (Pérez-Marín y col., 2012).

***Escherichia coli* en el tracto reproductor bovino (TRB)**

Escherichia coli ha sido descrita como un habitante normal del ecosistema vaginal (Otero y col., 2000), sin embargo se reconoce que las infecciones que ocasiona en el TRB poseen un impacto negativo importante en la productividad. Dicha bacteria ha sido reportada como una de las más comúnmente aisladas del útero en el posparto temprano y se asocia con mayores probabilidades de desarrollar enfermedades uterinas después del parto (Sheldon y col., 2010; Wang y col., 2013). Así, durante el posparto la colonización temprana del útero por *E. coli* ha sido asociada a reacción inflamatoria (infiltración de leucocitos polimorfonucleares e incremento de reactantes de fase aguda), descarga vulvar purulenta o muco-purulenta, magnitud de la metritis

y problemas en la restauración del estro (Bicalho y col., 2012). Asimismo, se ha informado que la presencia de *E. coli* en el endometrio en los primeros días posparto predispone a la colonización por *Arcanobacterium pyogenes*, patógeno responsable de metritis crónica e infertilidad (Sheldon y col., 2009). Magata y col. (2014) han reportado que la densidad de la población bacteriana potencialmente patógena en el útero de posparto y especialmente la presencia de *E. coli* son responsables de la alteración de la función ovárica durante el puerperio. En este sentido, los animales con metritis, en particular los asociados con la infección por *E. coli*, tienen una función y un crecimiento reducidos del folículo ovárico y son menos propensos a ovular aumentando el intervalo entre partos (Sheldon y col., 2002; Williams y col., 2007; Sheldon y col., 2009).

IV. TERAPIAS CONVENCIONALES

Frente a las infecciones del TRB, las terapias convencionales incluyen tratamientos locales y sistémicos con antibióticos de amplio espectro, antisépticos, hormonas y agentes antiinflamatorios (Malinowski y col., 2011; Haimerl & Heuwieser, 2014; Newby y col., 2017; Jeon y col., 2018). Estas sustancias se administran parenteralmente o se aplican directamente en el lumen uterino, para eliminar las bacterias, incrementar los mecanismos de defensa del tracto o aumentar el tono uterino y el flujo sanguíneo (Palmer, 2007; Haimerl & Heuwieser, 2014). Sin embargo, poseen ciertas desventajas entre las que se destacan: el costo de los tratamientos, la presencia de residuos en la leche (la cual debe ser desechada afectándose la producción), aparición y diseminación de resistencia antimicrobiana tanto en leche como en los productos cárnicos.

Los principales antibióticos que se han utilizado para tratar la metritis incluyen penicilina, oxitetraciclina, ampicilina y ceftiofur (Reppert, 2015). La aplicación de cada tratamiento con antimicrobianos conlleva una situación de presión selectiva para el surgimiento de bacterias resistentes, lo que destaca la importancia del uso moderado de estos quimioterápicos (Fishman, 2006; Ozawa y col., 2012). Varias publicaciones han demostrado la resistencia antimicrobiana emergente en microorganismos zoonóticos en animales de granja en todo el mundo, lo que representa una amenaza

potencial para la salud pública (Mann y col., 2011; Ozawa y col., 2012; Haimerl & Heuwieser, 2014). Así, el aumento de la resistencia a los antibióticos se asocia con una disminución de la eficacia clínica y podría afectar negativamente al bienestar animal, así como a la rentabilidad de los sistemas pecuarios (Haimerl & Heuwieser, 2014). Aunque la resistencia antimicrobiana en las bacterias responsables de infecciones uterinas no se evalúa con frecuencia (Malinowski y col., 2011), debe fomentarse el uso prudente de antibióticos y terapias alternativas en este nicho (Ozawa y col., 2012). Tales estrategias implican seleccionar el fármaco más adecuado en su dosis y duración óptimas para curar una infección, al tiempo que se minimicen los efectos secundarios y las condiciones de presión de selección de cepas resistentes (Fishman, 2006).

Asimismo, la aplicación de tratamientos antibacterianos no garantiza la resolución total de las infecciones del TRB (Malinowski y col., 2011) y tampoco mejora la fertilidad de las vacas tratadas (Azawi, 2008); incluso pueden ser perjudiciales para la funcionalidad de los leucocitos polimorfonucleares (PMN) uterinos, afectando su actividad fagocítica (Jeon y col., 2014; Mandhwani y col., 2017; Jeon y col., 2018).

Los tratamientos antibióticos locales y sistémicos no son los únicos que se aplican en los casos de enfermedades uterinas puerperales; además, se administran uterotónicos como prostaglandina F₂α (PGF₂α) y oxitocina (Heppelmann y col., 2018), con el objetivo de aumentar la contractilidad para facilitar el drenaje del contenido uterino y la involución uterina, preservando la fertilidad (Bajcsy y col., 2006). Los resultados obtenidos con estos tratamientos son ambiguos (Frazer, 2005). Así algunos estudios reportan que el uso de dichos fármacos durante el período puerperal temprano no mejora el rendimiento reproductivo en vacas sanas ni en vacas con enfermedades uterinas (Barrett y col., 2009; Jeremejeva y col., 2010).

Como tratamiento de apoyo a la terapia con antibióticos en la metritis puerperal se aplican antiinflamatorios no esteroides (AINEs) (Pohl y col., 2016). Estos fármacos tienen efecto analgésico, antiinflamatorio, antipirético y antiendotóxico, por lo que son considerados promotores del bienestar y la salud animal (Fitzpatrick y col., 2004; Laven y col., 2012). Asimismo, la terapia con analgésicos puede ser beneficiosa ya que el dolor también puede generar efectos secundarios, por ejemplo, reducir la producción de leche durante el posparto y aumentar el riesgo frente a algunas

enfermedades (Newby y col., 2017). Richards y col. (2009) evaluaron la administración de ketoprofeno, un AINE con un tiempo de retirada en leche de 0 días y observaron que las vacas tratadas tenían menos probabilidades de incurrir en retención de placenta, en comparación con las vacas sin tratar.

V. TERAPIAS ALTERNATIVAS

Las tendencias actuales ejercen presión sobre los productores en el momento de elegir las tecnologías que aplicarán en la elaboración de alimentos de origen animal, haciendo especial énfasis en las condiciones higiénico-sanitarias y de seguridad alimentaria. La necesidad de prescindir de antibióticos, hormonas u otros agentes químicos, que pueden permanecer en forma residual en los alimentos y afectar la calidad de la producción y la salud del consumidor, ha llevado al desarrollo de nuevos productos que puedan ser aplicados en estos sistemas de producción pecuaria (Machado y col., 2014). Algunos han investigado la eficacia de fármacos alternativos o preparaciones para la prevención y el tratamiento de la metritis bovina, como ser el uso de probióticos (Otero y col., 2006; Genis y col., 2018), nanopartículas de plata (Gurunathan y col., 2018), extractos vegetales (Pinedo y col., 2015; Mandhwani y col., 2017), y micropartículas de quitosán (Daetz y col., 2016; Jeon y col., 2016).

La administración intravaginal de bacterias probióticas se ha propuesto como una alternativa para prevenir las infecciones uterinas posparto así como la inflamación *in vivo* (Deng y col., 2015a,b). Bacterias lácticas autóctonas del TRB se han estudiado y seleccionado por su capacidad de inhibición de patógenos y de adhesión a células vaginales bovinas. Asimismo, se han optimizado las condiciones de microencapsulación, inclusión en cápsulas de glicogelatina y/o en ampollas selladas para constituir un producto de aplicación local (Otero y col., 2006, 2007; Otero y Nader-Macías, 2006; Ale y col., 2015). Por su parte, Genis y col. (2016) han demostrado la efectividad de una combinación de microorganismos benéficos (*Lactobacillus rhamnosus*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus sakei*) para reducir la inflamación y la infección por *E. coli* en células endometriales.

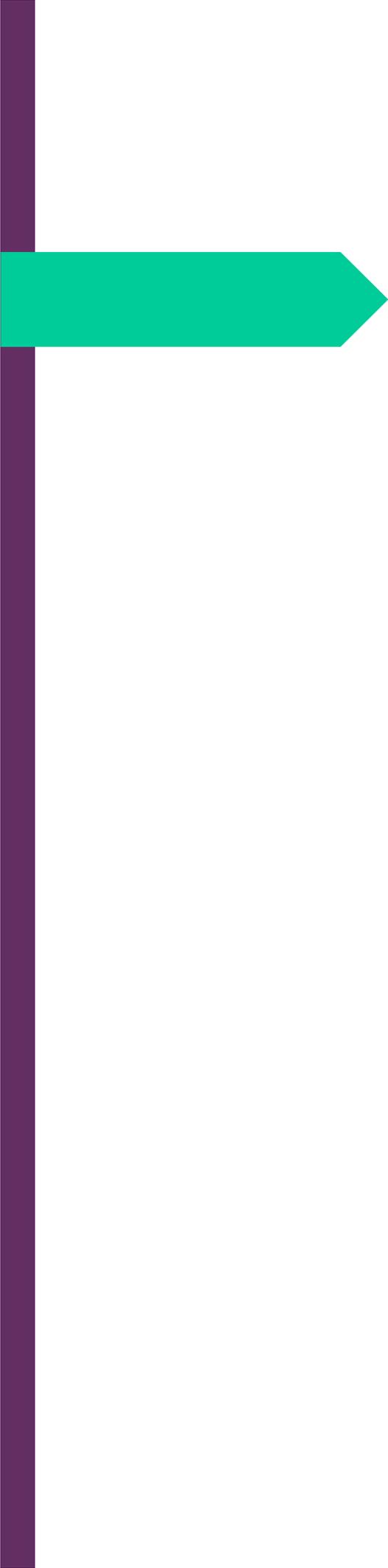
La aplicación de nanopartículas ha generado un gran interés en varios campos, incluyendo la biotecnología, las ciencias biomédicas y la medicina veterinaria

(Gurunathan y col., 2018). Las nanopartículas de plata presentan gran potencial contra bacterias resistentes a antibióticos como *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* que causan mastitis en bovinos (Leid y col., 2012). Asimismo, se ha evaluado la eficacia de las mismas frente a bacterias patógenas (*Prevotella melaninogenica* y *Arcanobacterium pyogenes*) nativas del TRB, inhibiendo la viabilidad celular y la capacidad de formación de biofilm (Gurunathan y col., 2018).

Otra opción novedosa alternativa a los tratamientos antibióticos son los extractos de plantas medicinales o sus componentes debido a la actividad antimicrobiana, antiinflamatoria y/o antioxidante que poseen muchos de ellos, lo cual depende de la especie de la cual fueron obtenidos (Mandhwani y col., 2017). El efecto de extractos vegetales en afecciones del TRB ha sido estudiado tanto *in vitro* (Galarza Álvarez, 2013; Kumar y col., 2013) como *in vivo* (Sarkar y col., 2006; Pinedo y col., 2015). Pinedo y col. (2015) evaluaron el efecto del carvacrol, un aceite esencial obtenido a partir del orégano, para el tratamiento de la metritis bovina y determinaron que incrementa la tasa de curación y el índice de preñez. Esta alternativa terapéutica implica su administración intrauterina e intenta incorporarse en protocolos con restricciones en el uso de antibióticos, particularmente en el ganado lechero.

La infusión intrauterina de otras sustancias con propiedades antimicrobianas como el yodo y la dextrosa fueron evaluadas en vacas con metritis posparto (Maquivar y col., 2015), observándose una tendencia a mejorar las tasas de curación de la metritis y de preñez por inseminación artificial.

Las micropartículas de quitosán se han desarrollado para ejercer una actividad antimicrobiana de amplio espectro contra patógenos bacterianos, incluidas bacterias resistentes a múltiples fármacos. Jeon y col. (2016) observaron la eficacia del tratamiento intrauterino con micropartículas de quitosán en la resolución de la metritis y fue comparable al tratamiento con ceftiofur. Sin embargo, en otro estudio Daetz y col. (2016) no obtuvieron resultados favorables al evaluar la administración intrauterina del mismo compuesto, como terapia preventiva de la metritis posparto; por lo que este tipo de tratamientos se encuentra todavía en fase experimental y debe ser estudiado con mayor profundidad.



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS GENERALES

Méd. Vet. Candelaria Gonzalez Moreno

HIPÓTESIS

Las *Escherichia coli* nativas del TRB de hembras comprometidas en sus capacidades reproductivas presentan perfiles de resistencia a antimicrobianos y de patogenicidad que les son característicos; y pueden ser controladas por su sensibilidad a extractos de origen vegetal.

OBJETIVOS GENERALES

Estudiar la microbiota nativa del TRB de hembras bovinas con diferentes condiciones clínicas y performance reproductiva, con especial interés en la población de *Escherichia coli*, las cuales serán aisladas y seleccionadas en función de los perfiles de patogenicidad. Asimismo, se evaluará la sensibilidad de los aislados frente a extractos de origen vegetal. Los resultados obtenidos permitirán sentar las bases para el diseño de formulaciones de aplicación veterinaria destinadas a mejorar la calidad sanitaria del TRB.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- a) Evaluar perfiles de la microbiota indígena del TRB, presentes en hembras con diferentes condiciones clínico-reproductivas, pertenecientes a dos tipos de explotación bovina: producción de carne y de leche.
- b) Aislar, caracterizar y seleccionar *E. coli* nativas del TRB prevalentes en la región del NOA según:
 - b-1) patrones de resistencia a antimicrobianos y presencia de factores de virulencia asociados a *E. coli* enteropatogénica.
 - b-2) perfiles de patogenicidad asociados a *E. coli* extra-intestinales.
 - b-3) Seleccionar *E. coli* nativas que exhiban los perfiles (de patogenicidad y resistencia) de mayor riesgo sanitario para el TRB.
- c) Evaluar la sensibilidad de *E. coli* con mayor potencial patogénico frente a extractos de origen vegetal, para avanzar en el diseño de estrategias veterinarias sustentables para la prevención y control de trastornos reproductivos asociados a *E. coli*.



CAPÍTULO 1

**EVALUACIÓN DE LAS POBLACIONES MICROBIANAS
DEL TRACTO REPRODUCTOR BOVINO (TRB) EN
HEMBRAS CON DIFERENTE PERFIL CLÍNICO Y
SISTEMAS PRODUCTIVOS**

Méd. Vet. Candelaria Gonzalez Moreno

1. INTRODUCCIÓN

El ambiente vaginal es clave en la preservación de la función del sistema reproductivo, ya que representa la primera barrera para proteger a las otras porciones del tracto reproductor (TR). Así, la vagina alberga un ecosistema en el que la microbiota residente está en permanente interacción con la mucosa del hospedador y constituye la primera línea de defensa frente al ingreso de microorganismos foráneos causantes de infecciones que pueden poner en riesgo la fertilidad (Vitali y col., 2012; Penna y col., 2013; Lorenzen y col., 2015; Bicalho y col., 2017a). Diferencias en la composición de la microbiota vaginal, incluyendo cambios temporarios en un individuo, son causados por una complicada interacción entre el medio ambiente, las características del hospedador y el comportamiento del mismo (Lewis y col., 2017). Si bien dicha interacción todavía no ha sido comprendida totalmente, estudios realizados en mujeres han revelado correlaciones entre problemas reproductivos (riesgo de fallas en la fertilidad, partos prematuros) y factores microbianos (Huang y col., 2014; DiGiulio y col., 2015; Prince y col., 2016). Un estudio realizado por DiGiulio y col. (2015) demostró que, como mínimo, la presencia o ausencia de especies microbianas específicas podría ser un indicador de trastornos reproductivos en las mujeres, por lo que el microbioma vaginal de una mujer sana puede contribuir significativamente al éxito reproductivo y a la prevención de un estado de enfermedad.

Históricamente, el estudio de la microbiota asociada al TR en hembras bovinas se ha enfocado en explorar las poblaciones que colonizan útero, especialmente durante el posparto (Jeon y col., 2015, 2016; Bicalho y col., 2016, 2017b; Clemmons y col., 2017). Recientemente se ha propuesto que la microbiota asociada al TR bovino (TRB) posee un papel crítico en el mantenimiento de la homeostasis en el entorno uterino y vaginal así como la tasa de preñez y el éxito reproductivo en las vacas (Clemmons y col., 2017). Esta microbiota indígena que coloniza la mucosa vaginal de vacas sanas está constituida por una combinación de microorganismos aerobios, anaerobios facultativos y anaerobios estrictos, que incluye cocos y bacilos Gram positivos (*Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.* y *Enterococcus sp.* y *Lactobacillus sp.*), así como Enterobacterias (Otero y col., 1999, 2000;

Wang y col., 2013). Sin embargo, esta microbiota puede ser modificada por factores intrínsecos como factores fisiológicos, hormonales, inmunológicos y nutricionales; o extrínsecos, como por ejemplo, las terapias antibióticas y hormonales, el manejo reproductivo y la alta densidad animal de algunos sistemas de cría (Nader-Macias & Otero, 2009). Así, las vaquillonas y vacas que experimentan problemas de fertilidad o del mantenimiento de la gestación pueden tener en el TR una microbiota diferente (Clemmons y col., 2017).

Asimismo, el microbioma vaginal desempeña un papel fundamental en la salud y en la enfermedad del TRB, incluida la protección contra patógenos por competencia directa (Clemmons y col., 2017); además, sus poblaciones microbianas constituyen la fuente de contacto inicial con el neonato durante el parto, a partir de la cual sus mucosas estériles son rápidamente colonizadas por microorganismos tanto benéficos como potencialmente patógenos (Gyles & Fairbrother, 2010; Schmidt y col., 2011).

Cuando las poblaciones residentes en vagina se componen principalmente de géneros con potencial patogénico, la homeostasis uterina se ve frecuentemente comprometida por la contaminación bacteriana vaginal ya que dichos microorganismos pueden ascender al útero causando enfermedad. Esto puede suceder en momentos productivamente críticos en que el cérvix se encuentra abierto: **a-** durante el posparto, donde la persistencia de bacterias patógenas puede causar infertilidad (Sheldon & Dobson, 2004; Bicalho y col., 2012); **b-** durante el estro, por ejemplo, en la aplicación de protocolos de sincronización para Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (IATF) (Clemmons y col., 2017).

La infección uterina en vacas es un fenómeno común después del parto. Cuando las vacas no logran erradicar naturalmente los microorganismos potencialmente patógenos, la función uterina se ve comprometida (Sheldon y col., 2006; Jeon & Galvão, 2018). *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes*, *Fusobacterium necrophorum* y *Prevotella melaninogenica* se aislaron frecuentemente del lumen uterino de vacas con metritis, y han sido clasificados como patógenos primarios que causan enfermedad uterina, ya que se demostró que afectan el endometrio y la función ovárica (Sheldon y col., 2002, 2010; Williams y col., 2005; Miller y col., 2007; Bicalho y

col., 2012). En particular, *E. coli* coloniza el útero a los pocos días después del parto, seguida de *T. pyogenes* y *F. necrophorum*, sugiriendo que los patógenos uterinos trabajan sinérgicamente (Jeon & Galvão, 2018).

Debido a las limitaciones en los métodos de cultivo bacteriano, estudios recientes han utilizado estudios metagénicos como una herramienta eficaz para identificar la comunidad bacteriana en el útero de hembras bovinas (Santos y col., 2011; Bicalho y col., 2017b; Jeon y col., 2016, 2017). Mediante dicha técnica molecular se ha revelado que la comunidad bacteriana uterina difiere entre vacas con y sin metritis posparto, demostrando que el útero comienza a establecer la estructura del consorcio microbiano hacia la salud o la enfermedad poco después del parto. En base a los resultados de varios trabajos científicos, Jeon & Galvão (2018) concluyeron que los géneros *Bacteroides*, *Porphyromonas* y *Fusobacterium* juegan un papel clave en el desarrollo de metritis. Estos cuadros de metritis pre y posparto, como la endometritis infecciosa, pueden evolucionar a infecciones subclínicas de tipo crónicas ocasionando trastornos de la fertilidad o infertilidad como por ejemplo en el Síndrome de Vaca Repetidora de celo (SVR) (Bhat y col., 2014).

La IATF es una técnica que, mediante la utilización de hormonas, permite sincronizar el celo y la ovulación para luego inseminar una gran cantidad de animales en un período corto de tiempo (Raso, 2012). El protocolo de control del ciclo estral más utilizado en la región del NOA se basa en la utilización de un dispositivo intravaginal de liberación de progesterona (en inglés “*progesterone-releasing intravaginal device*”: PRID) y se complementa con la aplicación de prostaglandina y de estrógenos por vía parenteral que ayudan a sincronizar la ovulación. Esto permite la obtención de lotes de terneros más parejos y un ahorro en la mano de obra utilizada al agrupar los celos en un periodo corto de tiempo. La incorporación del PRID a los protocolos de IATF ha mejorado significativamente la sincronización del estro, así como la tasa de concepción luego de la primera inseminación (Murugavel y col., 2003). El manejo reproductivo planificado mediante la utilización de protocolos de sincronización de los ciclos estrales ha incrementado la eficiencia reproductiva global de las explotaciones bovinas. Sin embargo, pocos trabajos científicos han estudiado el efecto del PRID sobre la microbiota vaginal

(Padula & Macmillan 2006; Walsh y col., 2008; Fischer-Tenhagen y col., 2012); estos autores, mediante técnicas de cultivo, han demostrado un alto grado de desarrollo de bacterias piógenas a partir de hisopados vaginales. Tanto Walsh y col. (2008) como Fischer-Tenhagen y col. (2012) observaron descarga vaginal (DV) purulenta en vaquillonas tratadas con PRID durante 7 días. Fischer-Tenhagen y col. (2012) reportaron que en los casos graves de DV, se aislaron bacterias piógenas como *Arcanobacterium pyogenes*, además de coliformes y *Streptococcus sp.* Asimismo, se ha reportado que el uso de estos dispositivos durante el posparto temprano no solo altera los perfiles microbianos a nivel vaginal, sino que también modifica la microbiota uterina. Sin embargo, hasta donde tenemos conocimiento, ningún estudio ha evaluado los cambios que pueden suceder en las poblaciones microbianas vaginales debido al tratamiento con PRID, utilizando técnicas independientes de cultivo.

En base a lo descripto anteriormente, surge la hipótesis de que la región craneal de vagina es colonizada por comunidades microbianas diferentes según se trate de vaquillonas vírgenes (que están edad y peso adecuado para recibir servicio), vaquillonas sincronizadas (con protocolos con PRID) o en vacas con trastornos de la fertilidad (enfermedad uterina y SVR).

2. OBJETIVO ESPECÍFICO

Evaluar perfiles de la microbiota indígena del TRB, presentes en hembras con diferentes condiciones clínico-reproductivas, pertenecientes a dos tipos de explotación bovina: producción de carne y de leche.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ANIMALES

Las muestras utilizadas en el presente trabajo se obtuvieron de 14 vaquillonas raza Braford (producción de carne); y de 20 vaquillonas y 49 vacas, ambas raza Holando Argentino (producción de leche). Las hembras de carne pertenecían al Instituto de Investigación Animal del Chaco Semiárido (INTA-Leales, Tucumán), mientras que las lecheras a tambos de la cuenca lechera Tapia-Trancas (Provincia de Tucumán).

3.1.1. CATEGORÍAS DE ANIMALES

Se seleccionaron hembras según los siguientes criterios:

-Vaquillonas clínicamente sanas (Vs): Vaquillonas (edad: 18 ± 2 meses) tanto de raza Braford como Holando Argentino. Ninguna de las vaquillonas había sido previamente inseminada o servida naturalmente. Al momento de la toma de muestras no presentaron signos de vaginitis, según los resultados de la exploración vaginoscópica realizada. El muestreo de las vaquillonas Braford correspondió con el día 0 del protocolo de sincronización de la ovulación, previo a la colocación del dispositivo PRID.

-Vaquillonas con vaginitis muestreadas el día 11 del protocolo de sincronización de ovulación (Via): Vaquillonas Braford que exhibieron vaginitis positiva a la exploración vaginoscópica en el día 11, día en que, según el protocolo de sincronización de la ovulación, debe realizarse la IA.

-Vaquillonas sincronizadas muestreadas el día 60 del protocolo de sincronización de ovulación (Vp): esta muestra corresponde a las **Via**, muestreadas 60 días después de iniciado el protocolo de sincronización de la ovulación. Se observó que ninguna vaquillona presentaba vaginitis al examen vaginoscópico al momento de la toma de muestra. Cabe aclarar que en este trabajo de tesis no se inseminó a las vaquillonas, de modo tal que las vaquillonas de este lote se encontraban ciclando normalmente al momento del muestreo.

-Vacas con enfermedad uterina (V_{mt}): Vacas raza Holando Argentino (4±1 años) con enfermedad uterina (metritis puerperal, metritis clínica y endometritis clínica), presentando sintomatología hasta el día 60 posparto.

-Vacas repetidoras de celo (V_r): Vacas raza Holando Argentino (4±1-años) con genitales aparentemente sanos que no se preñaron luego de tres o más servicios, pero exhibieron celo normalmente.

3.1.2. PROTOCOLO DE SINCRONIZACIÓN DE OVULACIÓN

Las vaquillonas se sincronizaron utilizando un protocolo de sincronización de ovulación basado en la administración de progesterona mediante un dispositivo intravaginal (**Figura 3**), ya que es el protocolo de uso corriente en las explotaciones bovinas del NOA en dicha categoría de animales. En el día 0, se colocó en cada vaquillona un dispositivo intravaginal de liberación de progesterona (en inglés *progesterone-releasing intravaginal device*: PRID)(Pro-ciclar P4 Zoovet®; 750 mg P4; Productos Veterinarios S.A., Argentina) seguido de la administración por vía intramuscular (IM) de D+cloprostenol (2 mL Ciclar®; Productos Veterinarios S.A., Argentina) y Benzoato de estradiol (1 mL Benzoato de estradiol Zoovet®; Productos Veterinarios S.A., Argentina). En el día 9 el PRID fue retirado y se administraron IM D+cloprostenol (2 mL PGF Ciclar®, Productos Veterinarios S.A., Argentina) y cipionato de estradiol (1 mL Cipionato de Estradiol Zoovet®; Productos Veterinarios S.A., Argentina). A fin de comprobar el éxito del protocolo de sincronización del estro, se realizó la detección de celo en el día 10.

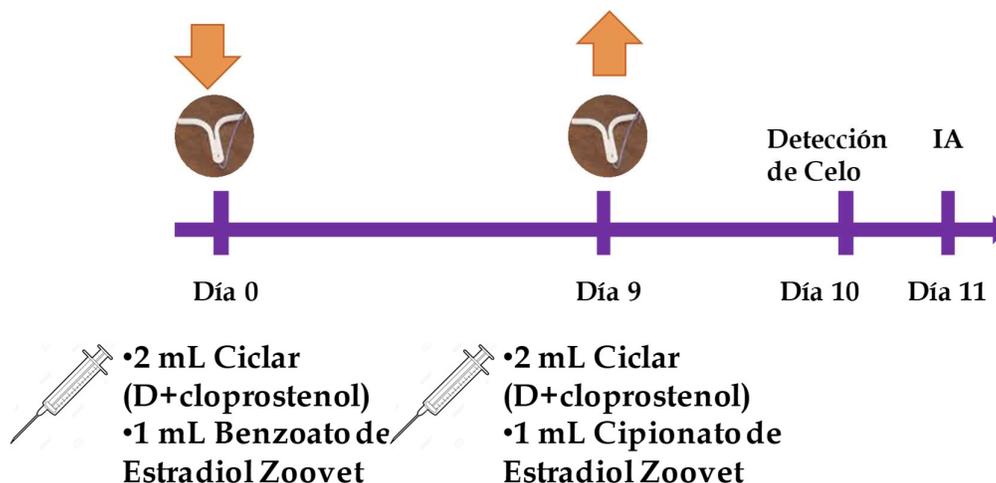


Figura 3. Esquema del protocolo de sincronización de ovulación utilizado en vaquillonas.

3.2. EVALUACIÓN CLÍNICA

Se evaluó el estado general de los animales, así como su condición corporal: todas las vaquillonas y vacas incluidas en el estudio fueron evaluadas como aptas para el ensayo y poseían una condición corporal de 3, en una escala de 5 puntos (1=emaciado a 5=obeso) definida por Ferguson y col. (1994). A su vez, el TRB de todos los animales muestreados fue previamente examinado por un veterinario mediante palpación transrectal, y se determinó que el total de las hembras eran aptas para la reproducción.

Una vez que las vacas y vaquillonas fueron colocadas en la cabina de trabajo de la manga, se evaluó, mediante observación con vaginoscopio, el aspecto de la mucosa vaginal en la región craneal (rubor, edema), también la presencia y características del moco. En base a estas observaciones, se calificó de manera cuantitativa la presencia y tipo de descarga vaginal (DV) presente en cada animal para lo cual se definió un **Score de Descarga Vaginal (SDV)** con una escala de 4 puntos: **0**, ausencia de mucus/+ mucus claro y fluido (poca cantidad); **1**, ++/+++ moco claro, fluido (regular/profuso); **2**, fluido blanco-amarillento; **3**, mucus blanco y denso.

3.3. TOMA DE MUESTRAS

Previo al muestreo, los animales fueron ubicados individualmente en la cabina de trabajo de la manga para su correcta sujeción. Seguidamente, a cada animal se le realizó la limpieza de la zona perineal y vulvar con abundante agua y posterior secado con toallas de papel.

La evaluación del estado de la mucosa vaginal y la toma de muestras se realizó previa colocación de un vaginoscopio, al cual se le aplicó una pequeña cantidad de gel lubricante (0,8% p/v carbopol, 1% v/v trietanolamina, 10% v/v glicerol, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) estéril libre de antisépticos preparado en nuestro laboratorio.

A continuación, se realizó la toma de muestras con *citobrush* e hisopo estéril (adosados a un mango de longitud apropiada), raspando suavemente la pared de la región craneal de vagina recolectando material para estudios bacteriológicos y citológicos, respectivamente (Kasimanickam, 2005) como se ilustra en la **Figura 1**. Cada *citobrush* cargado fue recolectado en un tubo Falcon con 1 mL de solución salina tamponada (PBS) pH 7,0 y se mantuvo refrigerado (8°C) hasta su procesamiento; con el material de cada hisopo se realizaron extendidos sobre dos portaobjetos y se fijaron inmediatamente con etanol 96°. El tiempo transcurrido, entre la toma de muestras y su procesamiento fue inferior a 3 h.



Figura 1. Toma de muestra por raspado de la pared de la zona craneal de vagina.

3.4. EVALUACIÓN CITOLÓGICA

Dos portaobjetos de cada muestra fueron teñidos con la técnica de May-Grunwald-Giemsa (McDougall y col., 2011). Luego se realizó el recuento diferencial de 100 células (células epiteliales y leucocitos) al microscopio óptico y se calculó el porcentaje de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) para determinar el estado inflamatorio de la vagina de las hembras muestreadas. En base a la celularidad (cantidad y tipo de células observadas) se definió el **Score de Citología Vaginal (SCV)**. Para ello se evaluó la presencia de colgajos, porcentaje de PMN y de clústeres de neutrófilos incluidos en una red extracelular de fibrina (definidos como NET):

- **Grado I**, + celularidad & PMN < 10%
- **Grado II**, +/++ celularidad & PMN > 10%
- **Grado III**, ++/+++ celularidad & PMN > 10% (escasa NET)
- **Grado IV**, celularidad & PMN > 10% (abundante NET).

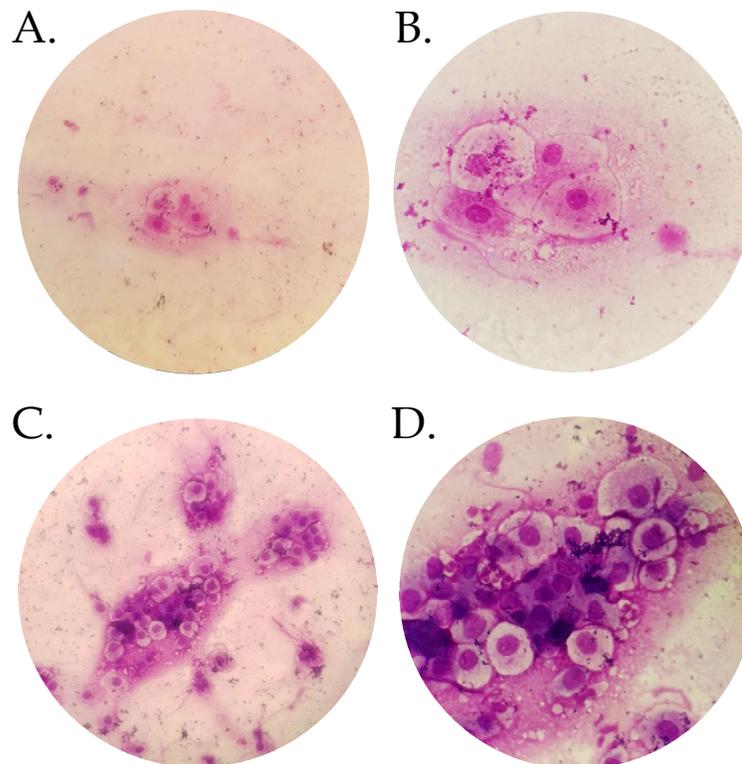


Figura 2. Score Citología Vaginal (SCV), tinción de May-Grunwald-Giemsa. Muestra con grado I: escasa celularidad, PMN<10% magnificación de 400x (A) y 1000x (B). Muestra grado III: moderada celularidad, presencia de fibrina y PMN>10%, magnificación 400x (C) y 1000x (D).

Para la determinación del estado de salud de la vagina de las vacas, el SDV, SCV y la presencia de NET fueron analizados para definir el **diagnóstico de vaginitis**:

Negativo (SDV = 0, 1 o 2 y SCV = I);

Positivo (SDV = 1, 2 o 3 y SCV = II, III o IV).

3.5. EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA

3.5.1. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Los tubos Falcon conteniendo los *citobrushes* se agitaron en vórtex durante 2 min para favorecer la liberación de las bacterias retenidas. A partir de las suspensiones obtenidas se realizaron estudios microbiológicos dependientes e independientes de cultivos; 100 μL de cada muestra fueron destinados al estudio y cuantificación de las poblaciones microbianas cultivables (UFC mL^{-1}) (ver ítem 2.4.3). El material restante fue centrifugado (3000 g) durante 10 min a 4 °C, se lavó en PBS estéril y se centrifugó nuevamente durante 5 min a 4 °C. Finalmente, los pellets se suspendieron en 200 μL de PBS y se conservaron a -80°C para los estudios microbiológicos independientes de cultivo.

3.5.2. ESTUDIOS MICROBIOLÓGICOS INDEPENDIENTES DE CULTIVO

El análisis de la diversidad bacteriana presente en el TRB se realizó utilizando dos métodos moleculares. Como primera herramienta, se empleó la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida con gradiente desnaturizante (en inglés *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*: DGGE). Luego se realizó un análisis metagénico (amplificación del gen 16S ARNr) de las muestras vaginales, con el objetivo de lograr una mejor definición de las poblaciones bacterianas presentes en los diferentes grupos de animales estudiados.

3.5.2.1. EXTRACCIÓN DEL ADN TOTAL DE LAS MUESTRAS VAGINALES

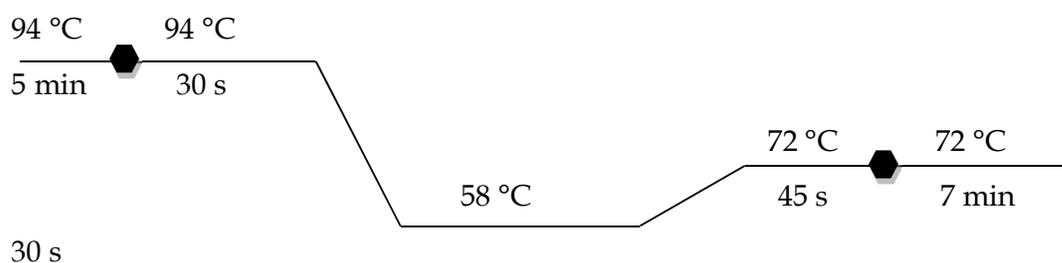
La extracción y purificación del ADN total de cada muestra se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante (QIAampADN Mini Kit; Qiagen, Alemania)

con pequeñas modificaciones como se detalla a continuación: a 200 μL de cada muestra se le adicionaron 20 μL de proteinasa K (Qiagen Protease, Qiagen, Alemania) y 200 μL de buffer de lisis y se incubaron a 56 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 h. Aquellas muestras con alto contenido de mucus, fueron tratadas con 30 μL de proteinasa K durante 2 hs a 56 $^{\circ}\text{C}$. El ADN de cada muestra fue purificado y eluido de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y luego conservado en buffer de elución a -80 $^{\circ}\text{C}$. La cuantificación y control de la integridad del ADN se realizaron previos a las reacciones de amplificación.

3.5.2.2. AMPLIFICACIÓN DEL GEN 16S ARNr Y ELECTROFORESIS EN GEL CON GRADIENTE DESNATURALIZANTE (DGGE)

Para incrementar la sensibilidad de la técnica de amplificación del ADN, se realizó una *nested PCR* previa a la DGGE (Fan y col., 2009). Se amplificó un fragmento de la región variable V3 del gen 16S ARNr a partir de la dilución 1:100 del ADN total extraído de cada muestra vaginal, con cebadores (P0 y P4) diseñados para el dominio Bacteria (Klijn y col., 1991). Seguidamente, 1 μL de cada producto de PCR fue utilizado como templado para la segunda ronda de PCR, utilizando los cebadores: V3f (GC), (50-CC GGG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG A CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG) y Uni-0515r (50-ATC GTA TTA CCG CGG CTG CTG CTG GCA-30) (Fontana y col. 2005). Todas las reacciones de amplificación se realizaron empleando PCR Master Mix (Promega, EE.UU.) y el termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, EE.UU.) según los siguientes protocolos, en volumen de reacción= 25 μL , molde= 1 μL de ADN total, con los ciclos de amplificación que se detallan:

Primera PCR



(utilizando la herramienta de mapeo de secuencias, <http://rdp.cme.msu.edu/>). La identificación a nivel de género se basó en un porcentaje de homología de secuencia $\geq 97\%$.

3.5.2.4. ANÁLISIS DE CLUSTERES

Los perfiles de bandas obtenidos por DGGE fueron analizados con el *software* FINGERPRINTING II (Bio-Rad Laboratories, EE.UU.). Para la construcción de dendogramas se utilizaron el coeficiente de correlación de Pearson y el método del grupo de pares no ponderado con promedios (en inglés *Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*: UPGMA).

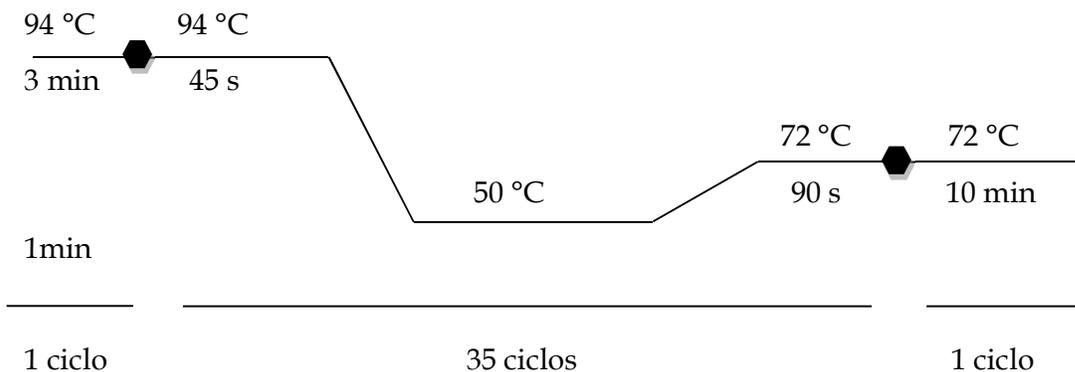
Análisis estadístico: se utilizó una tabla de contingencia para evaluar la relación entre el estado de salud y la prevalencia de *phylum* y género (se calculó la contribución a Chi-cuadrado) y se realizó un análisis multivariado de correspondencia para evidenciar asociación entre los taxones detectados y el grupo animal muestreado. El procesamiento de datos se llevó a cabo con los *softwares* MINITAB (ver.14) e InfoStat (versión 2015p).

3.5.2.5. AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN 16S ARNr. ENSAYO METAGÉNICO

La secuenciación del gen 16S ARNr fue realizada a partir del ADN extraído de las muestras vaginales según se describió en el ítem 2.5.2.1. Luego de la extracción del ADN total, se evaluó la concentración y pureza utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, EE.UU.) a longitudes de onda de 230, 260 y 280 nm. Seguidamente, se amplificó la región hipervariable V4 del gen 16S ARNr, utilizando cebadores 515f y 806r de acuerdo con la metodología optimizada para la plataforma Illumina MiSeq (Caporaso y col., 2012) y validada para muestras vaginales bovinas (Bicalho y col., 2017b); los cebadores reversos poseen un código de barras de corrección de errores Golay (12 pb) para el gen 16S ARNr (Caporaso y col., 2012; Bicalho y col., 2017a).

Los amplicones con códigos de barras de 5' fueron generados por triplicado empleando: la 1 × EconoTaq Plus Green Master Mix (Lucigen, EE.UU.), 12 a 300 ng de ADN y 10 μ M de cada cebador según el siguiente protocolo:

Volumen de reacción= 25 μ L; Ciclos de amplificación:



Antes de la secuenciación, los triplicados de los amplicones replicados fueron agrupados y purificados (PCR QIAquick, Qiagen, Alemania) y visualizados por electroforesis en gel de agarosa (1,2% p/v) teñido con bromuro de etidio (0,5 mg mL⁻¹). Se incluyeron controles de amplificación negativa. Posteriormente, los productos purificados se cuantificaron usando Quant-iT PicoGreen y un kit de ensayo de amplio rango de ADN de doble cadena purificado (Life Technologies Corporation, EE.UU.).

3.5.2.6. SECUENCIACIÓN Y BIOINFORMÁTICA

Alícuotas estandarizadas a la misma concentración de los productos purificados se utilizaron para preparar la biblioteca de ADN equimolar y finalmente realizar la secuenciación propiamente dicha usando el kit de reactivos MiSeq v2 (300 ciclos) en la plataforma MiSeq (Illumina Inc., EE.UU.). Las secuencias del gen 16S ARNr generadas se procesaron a través del *pipeline* de código abierto *Quantitative Insights into Microbial Ecology* (QIIME) versión 1.7.0-dev (Caporaso y col., 2012). Las secuencias se filtraron por calidad utilizando pautas preestablecidas (Bokulich y col., 2013). Dichas secuencias fueron agrupadas en unidades taxonómicas operacionales (OTU, del inglés *Operational Taxonomic Unit*) basado en el 97% de identidad

utilizando *UCLUST* (Edgar, 2010) contra la base de datos de referencia *Greengenes* (McDonald y col., 2012). *Clusters* de baja abundancia y secuencias quiméricas se eliminaron utilizando *USEARCH* (Edgar, 2010). Las secuencias representativas para cada OTU fueron comparadas contra la base de datos de *Greengenes* para su asignación taxonómica, para lo cual se utilizaron solo lecturas de larga duración y alta calidad ($-r=0$). El resultado es una clasificación de lecturas en múltiples niveles taxonómicos: reino, *phylum*, clase, orden, familia, género y especie.

Análisis estadístico: Los índices Shannon y Chao1 fueron estimados a través de QIIME. Previamente, se realizó el análisis de las curvas de rarefacción para las bibliotecas de cada muestra, a una profundidad de 10.000 secuencias usando dicho *pipeline*. Estos índices de diversidad se compararon entre todos los grupos utilizando la prueba de rango con signo de Wilcoxon (distribución no paramétrica).

Los OTU obtenidos del análisis bioinformático fueron utilizados para describirlas abundancias relativas a nivel de *phylum* y del menor nivel taxonómico observado en las muestras vaginales. Se calcularon los porcentajes de frecuencia relativa de lecturas de genes que codifican para 16S ARNr anotados al nivel taxonómico determinado. Los perfiles microbianos en cada grupo muestreado se describieron para los *phylum* y taxones más prevalentes usando la función de tabulación en JMP Pro13 (SAS Institute Inc., EE.UU.) con la utilización de la prueba de Wilcoxon (distribución no paramétrica). Diferencias con un valor de $P \leq 0,05$ se consideraron significativas, y aquellas con un valor de $0,05 < P \leq 0,10$ fueron considerados tendencias. Se realizó un análisis de coordenadas principales (en inglés *Principal Coordinates Analysis*: PCoA) de la disimilitud de Bray-Curtis en todas las muestras y cada grupo utilizando la abundancia relativa de las bacterias a nivel de *phylum*, y se analizaron diferencias significativas entre los grupos usando análisis de varianza multivariado no paramétrico (PERMANOVA) con 9999 permutaciones en PAST versión 3.13. La agrupación jerárquica de las comunidades microbianas en el nivel de *phylum* se generaron en base a Pearson con el *pipeline* Microbiome analyst (<http://microbiomeanalyst.ca/faces/home.xhtml>).

3.5.3. ESTUDIOS MICROBIOLÓGICOS DEPENDIENTES DE CULTIVO

Con las soluciones de PBS conteniendo el material desprendido del *cytobrush* producto del raspado vaginal se prepararon diluciones seriadas y 50 μ L de las mismas se sembraron en placas de Agar Mac Conkey y Agar Sangre (ver Anexo) para cuantificar enterobacterias, mesófilos totales y microorganismos hemolíticos. Las placas sembradas en Agar Mac Conkey fueron incubadas durante 48 hs a 37°C en condiciones aeróbicas, mientras que las de Agar Sangre, a 37 °C durante 48-72 hs en condiciones de microaerofilia. El número de microorganismos se expresó como log UFC mL⁻¹.

Análisis estadístico: los resultados se presentaron como valores medios y rangos intercuartiles (IQ); a su vez, se realizó un análisis de correlación entre las poblaciones de mesófilos totales y enterobacterias. Un valor de $P \leq 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Una tabla de contingencia fue utilizada para evaluar la relación entre el grupo animal y el *phylum*/taxón prevalente (se calculó la contribución a Chi-cuadrado) para luego realizar un análisis de correspondencia multivariado a fin de determinar la condición clínico-reproductiva y el taxón asociado. El procesamiento de los datos fue realizado mediante la utilización de los *softwares* JMP Pro13 e InfoStat (versión 2015p).

4. RESULTADOS

COMUNIDADES MICROBIANAS DEL TRACTO REPRODUCTOR EN GANADO DE CARNE: EFECTO DE UN PROTOCOLO DE SINCRONIZACIÓN DE OVULACIÓN EN VAQUILLONAS SANAS

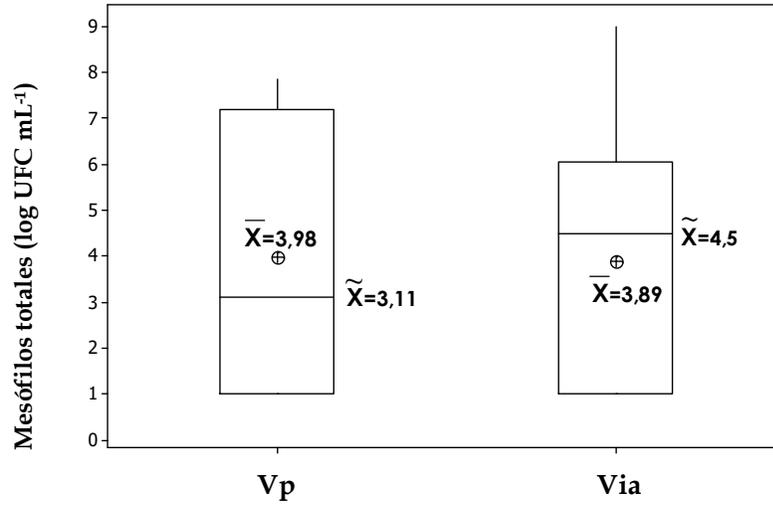
4.1. ENSAYO 1: POBLACIONES BACTERIANAS DEL ECOSISTEMA VAGINAL Y PERFIL CITOLÓGICO EN VAQUILLONAS DE CARNE SINCRONIZADAS CON PRID

En esta etapa experimental se tomaron muestras de las hembras incluidas en los grupos **Via** y **Vp**, descritos en el ítem 3.1.1.

4.1.1 ESTUDIOS DEPENDIENTES DE CULTIVO

El recuento de microorganismos mesófilos totales (**Figura 4a**) mostró valores promedios similares en las muestras de vaquillonas correspondientes a los días 11 y 60 del protocolo de sincronización de los grupos **Via** (media=3,98±0,89 log UFC mL⁻¹) y **Vp** (3,89±1,02 log UFC mL⁻¹), respectivamente. Sin embargo, los valores de medianas fueron 3,11 (**Vp**) y 4,5 (**Via**), mientras que el rango de datos fue entre 1 a 7,84 y 1 a 9 log UFC mL⁻¹, respectivamente. Los datos correspondientes a los recuentos de enterobacterias mostraron un comportamiento diferente (**Figura 4b**) ya que los valores medios y de medianas fueron similares en ambos grupos y la amplitud del rango de valores de los datos fue de 1 a 4,32 log UFC mL⁻¹ y 0 a 5,55 log UFC mL⁻¹, respectivamente.

A.



B.

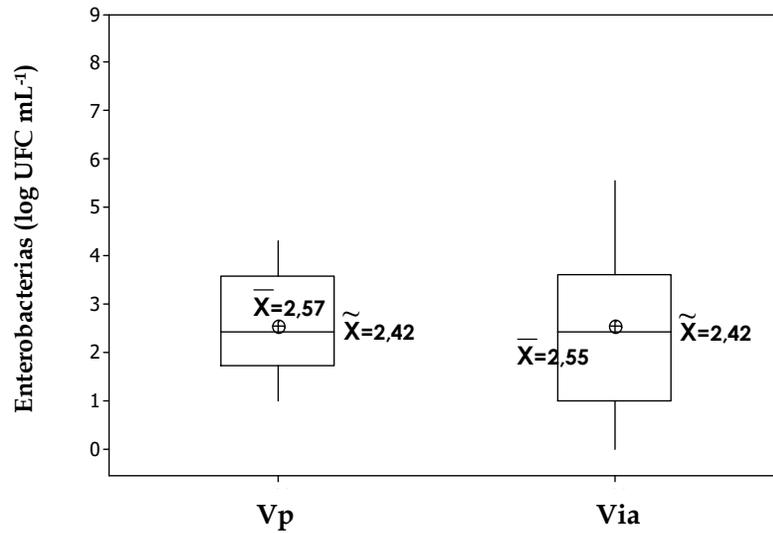


Figura 4. Recuento de microorganismos mesófilos totales (A) y enterobacterias (B) de la región craneal de vagina de vaquillonas sincronizadas. Muestras correspondientes a los días 11 (Via) y 60 (Vp) del protocolo; se indican los valores que representan medias y medianas para cada grupo de datos.

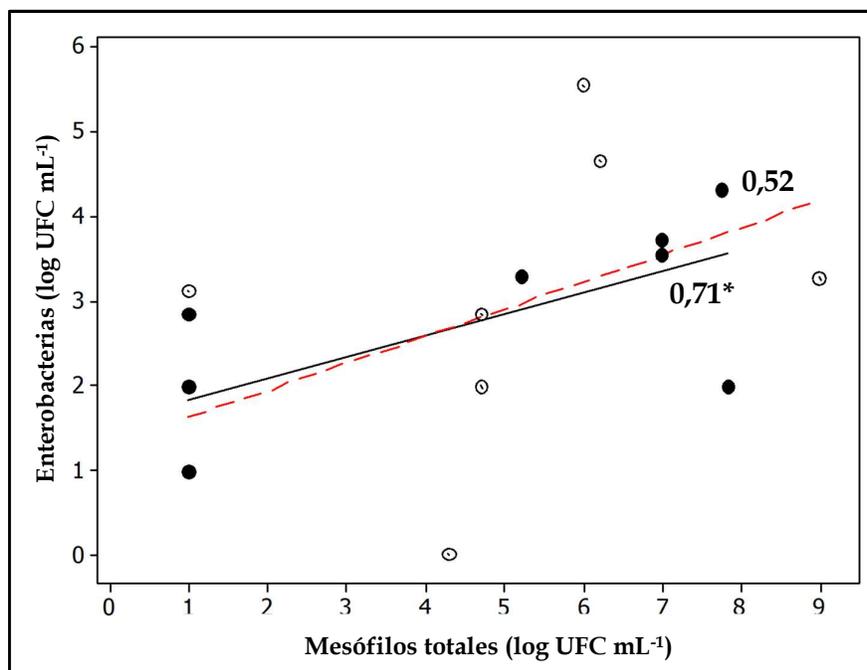


Figura 5. Correlación entre enterobacterias y mesófilos totales en los grupos de vaquillonas a los días 11 (**Via**) [---] y 60 (**Vp**) [----] del protocolo de sincronización de ovulación con PRID. Se indican los coeficientes de correlación de Pearson y la significación estadística (* $P < 0,05$).

Cuando se analizó la correlación entre ambas poblaciones microbianas, enterobacterias y mesófilos totales (**Figura 5**), se obtuvo una correlación positiva y significativa para el grupo **Vp** (Coeficiente de Pearson=0,771; $P < 0,05$) a diferencia de lo observado en el grupo **Via** donde el factor de correlación de Pearson (0,52) no fue significativo ($P > 0,05$).

Asimismo, en el recuento de los desarrollos obtenidos en las placas de Agar Sangre, se observó un mayor porcentaje de microorganismos α y β -hemolíticos en el grupo **Via** (60%) en comparación al grupo **Vp** (20%).

4.1.2 ESTUDIOS INDEPENDIENTES DE CULTIVO: ELECTROFORESIS EN GEL CON GRADIENTE DESNATURALIZANTE (DGGE)

El perfil de diversidad bacteriana obtenido por PCR-DGGE reveló diferencias en la estructura de las comunidades presentes en muestras de los grupos **Vp** y **Via** (**Figura 6**). El análisis de *clusters* reunió en un único grupo a todos los perfiles de las muestras del grupo **Vp**, incluyendo solo uno del grupo de las vaquillonas **Via**

(muestra 10). Sin embargo, cinco de estas once muestras fueron diagnosticadas como positivas para vaginitis cuando se evaluó de manera conjunta los índices de citológica y de DV. Por otra parte, al analizar la distribución de las muestras del grupo **Via** se observó que el 90% de los perfiles de DGGE de dicho grupo se agruparon en 2 *clusters*. Además, todas las muestras incluidas en estos 2 *clusters* fueron positivas para el diagnóstico de vaginitis y la presencia de agregados de polimorfonucleares en una red de fibrina (NET), con excepción de la muestra de **Via 7** (**Figura 6**).

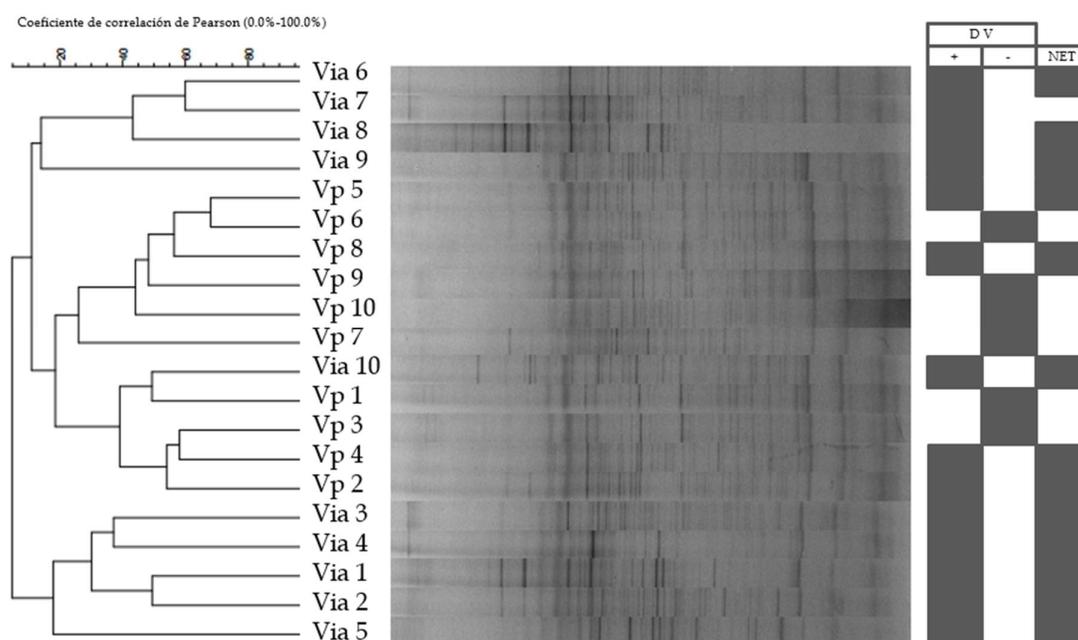


Figura 6. Análisis de los perfiles de bandas obtenidos por DGGE del amplificado de un fragmento del gen 16S ARNr, a partir del ADN total extraído de la microbiota vaginal de vaquillonas sincronizadas; muestras vaginales del día 11 (**Via**) y 60 (**Vp**) del protocolo. El dendrograma muestra similitudes entre los perfiles (coeficiente de correlación de Pearson). La escala indica porcentaje de similitud. La matriz a la derecha (casillas rellenas) indica diagnóstico de vaginitis (**DV**): + = positivo; - = negativo; así como, la presencia de NET en las muestras.

El análisis de correspondencia (**Figura 7**) reveló una asociación entre la sincronización y la prevalencia de determinados *phylum* bacterianos. La asignación taxonómica mostró que *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* y *Firmicutes* fueron los *phylum* dominantes en las microbiotas vaginales de las vaquillonas. De esta manera, *Firmicutes* y *Bacteroidetes* estuvieron presentes en muestras de ambos grupos,

mientras que el *phylum Proteobacteria* se asocia exclusivamente con el grupo **Via**. Por el contrario, secuencias que se correspondieron con *Actinobacteria* también estuvieron presentes; pero con menor frecuencia, y se observaron asociadas exclusivamente al grupo **Vp**.

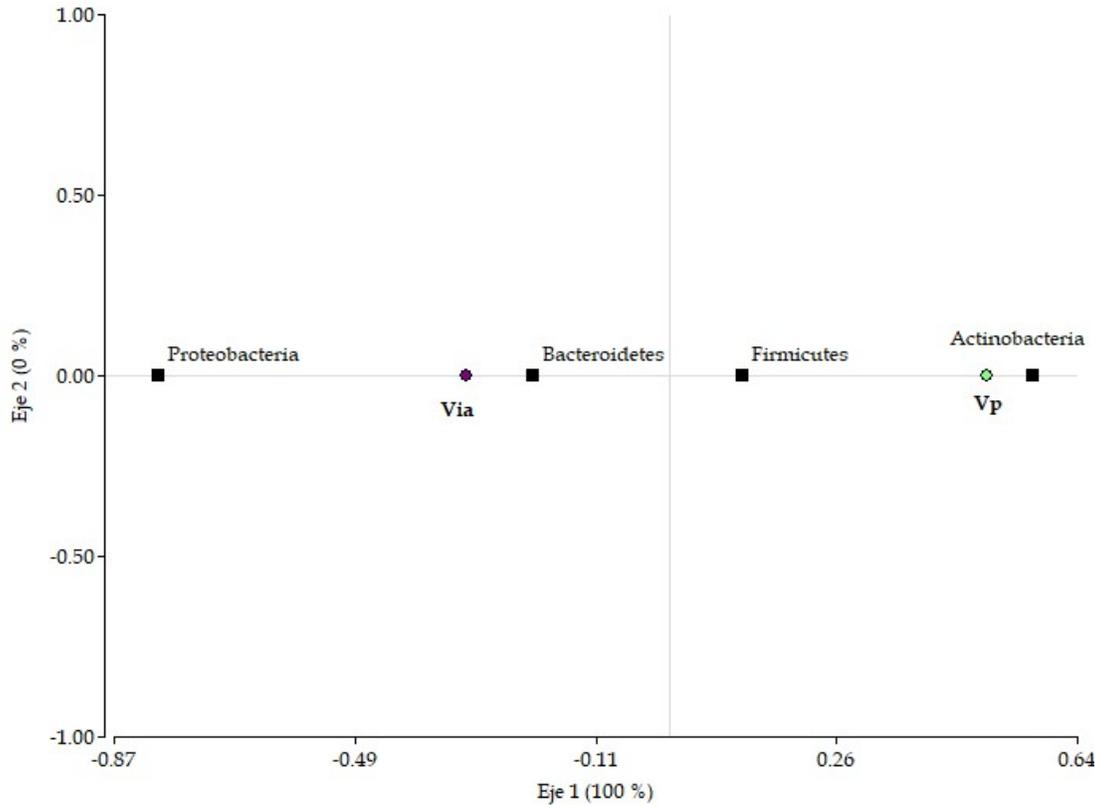


Figura 7. Análisis de correspondencia entre la composición de la microbiota vaginal a nivel de *phylum* y los grupos de vaquillonas sincronizadas muestreadas en día 11 (**Via**) y 60 (**Vp**) del protocolo de sincronización de ovulación con PRID. La contribución al Chi-cuadrado se indica entre paréntesis.

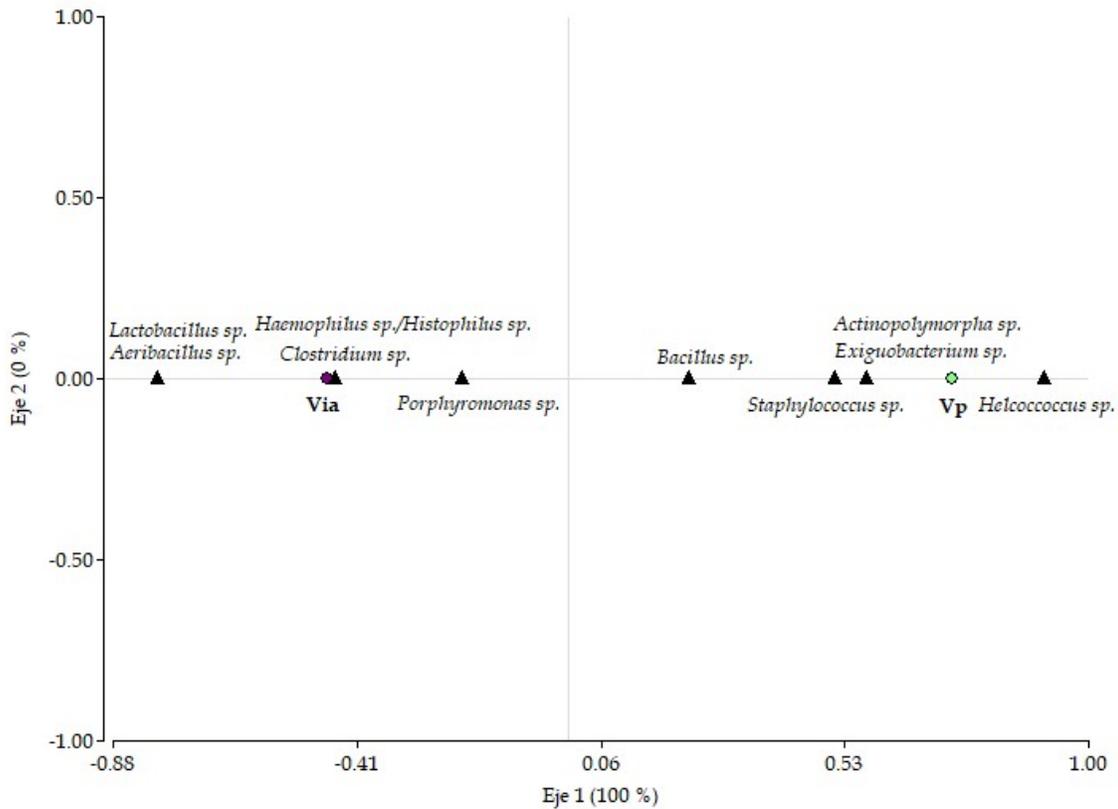


Figura 8. Análisis de correspondencia entre la composición de la microbiota vaginal a nivel de géneros y los grupos de vaquillonas sincronizadas muestreadas en día 11 (**Via**) y 60 (**Vp**) del protocolo de sincronización de ovulación con PRID.

Seguidamente, se aplicó un análisis de correspondencia similar, esta vez, para evaluar la asociación del grupo de vaquillona (**Via** y **Vp**) y los géneros bacterianos presentes en la microbiota vaginal (**Figura 8**). Secuencias de bandas con más del 97% de homología con *Lactobacillus*, *Aeribacillus*, *Haemophilus/Histophilus* y *Clostridium* solo se asociaron con el grupo **Via**. Asimismo, se observó una mayor asociación de *Helcoccoccus* con el grupo **Vp**. Sin embargo, las secuencias de bandas obtenidas de muestras de ambos grupos (**Via** y **Vp**) revelaron homología con *Porphyromonas*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Actinopolymorpha* y *Exiguobacterium*.

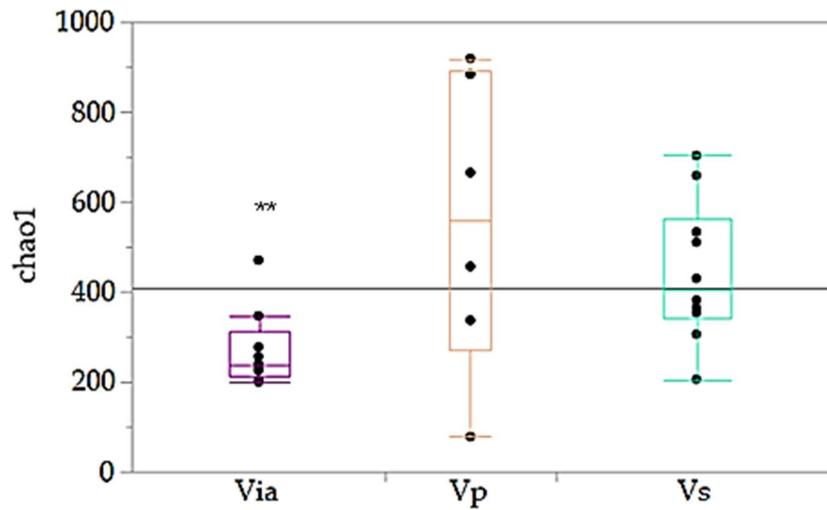
4.1.3 ESTUDIOS INDEPENDIENTES DE CULTIVO: ANÁLISIS METAGÉNICO DE LA COMUNIDAD BACTERIANA VAGINAL EN VAQUILLONAS SINCRONIZADAS

En esta etapa experimental se trabajó con las categorías animales: **Vp**, **Via** y **Vs**, descritas en el ítem 3.1.1.

La secuenciación de la región V4 del gen bacteriano 16S ARNr de las muestras vaginales de vaquillonas resultó en la obtención de 2.431 lecturas, con un promedio de 97 lecturas por muestra después de filtrar en base a la calidad de las mismas (la rarefacción se realizó con el *pipeline* QIIME).

En el presente trabajo la riqueza de especies, estimada mediante el índice de Chao1 (Jeon y col., 2016), fue significativamente más baja ($P < 0,01$, test de suma de rangos de Wilcoxon) para las lecturas correspondientes al grupo **Via** en comparación con las del grupo de las vaquillonas en el día 60 del protocolo (**Vp**) (**Figura 9A**). La diversidad de especies, evaluada mediante el índice de Shannon, que combina estimaciones de abundancia (número de especies diferentes) y homogeneidad (Shannon, 1997), no mostró diferencias significativas ($P < 0,05$, test de Wilcoxon) entre los grupos de vaquillonas (**Figura 9B**). Considerados en conjunto, los resultados indican que las microbiotas de vagina de las vaquillonas muestreadas el día de la IA (**Via**) presentaron una menor riqueza en comparación con las de las vaquillonas sanas (**Vs**), consideradas como día 0 del protocolo. Además, se observó que dicha riqueza podría recuperarse en un período post-sincronización (muestras del grupo **Vp**); sin embargo los tres grupos de muestras presentaron niveles similares de diversidad.

A.



B.

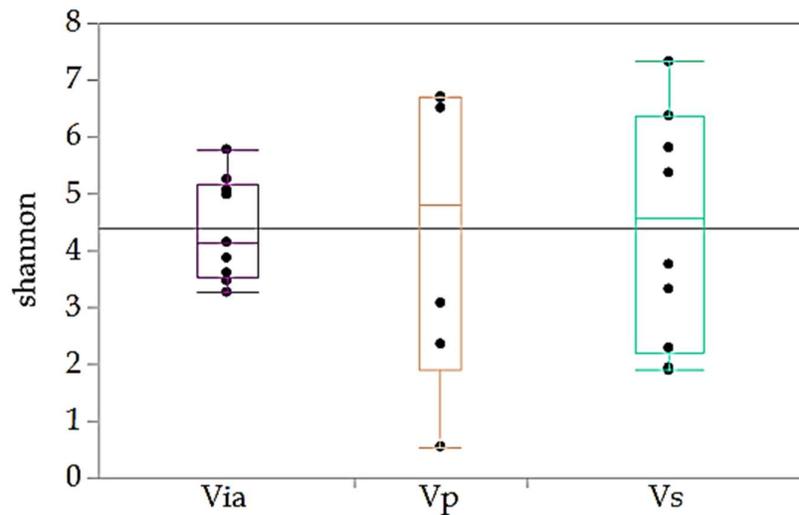


Figura 9. Estimación de la α -diversidad en la microbiota vaginal de vaquillonas. La riqueza calculada con el índice Chao1 (A) y la diversidad de especies con el índice Shannon (B). **: indica diferencias significativas ($P < 0,01$; test de Wilcoxon) entre los grupos de vaquillonas.

Con el objetivo de realizar un análisis más profundo del efecto del protocolo de sincronización con PRID sobre la composición microbiana vaginal, se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en la disimilitud de Bray-Curtis de la abundancia relativa de *phylum* bacteriano. Como se observa en la **Figura 10**, hubo diferencia significativa ($P=0,004$; PERMANOVA) entre la microbiota del grupo

Via y las de los otros dos grupos de animales, **Vp** y **Vs**; la gráfica muestra la similitud entre las microbiotas de estos dos últimos.

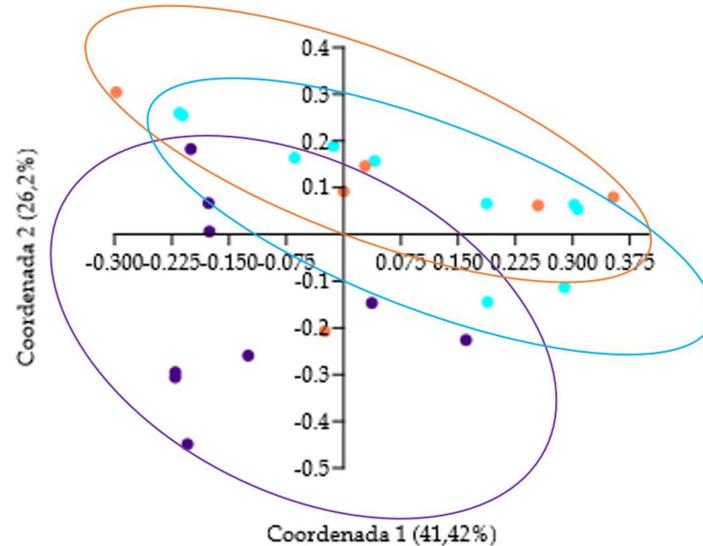


Figura 10. PCoA de la disimilitud de Bray-Curtis para las microbiotas vaginales de las vaquillonas de los grupos **Via** (violeta), **Vp** (coral) y **Vs** (aqua), en base a la abundancia bacteriana a nivel de *phylum* ($P=0,004$; PERMANOVA).

4.1.3-A COMPARACIONES A NIVEL DE *PHYLUM*

Para evaluar el efecto del protocolo de sincronización sobre la microbiota bacteriana vaginal de vaquillonas de carne, se aplicó un análisis de la varianza de Wilcoxon (no paramétrico) sobre la abundancia relativa bacteriana a nivel de *phylum* y se observó que existe un efecto significativo del grupo muestreado ($P<0,01$) (**Figura 11**). Si bien el estudio de la composición bacteriana reveló un total de 13 *phylum* (abundancia $\geq 1\%$ en cada muestra), la comparación de la abundancia relativa fue realizada únicamente para los seis *phylum* más prevalentes, lo que representa el 99,2% de las comunidades bacterianas: *Proteobacteria* (42,1%), *Firmicutes* (25,4%), *Tenericutes* (13,5%), *Fusobacteria* (8,8%), *Bacteroidetes* (8,2%) y *Actinobacteria* (1,2%). Los resultados indicaron que la abundancia relativa de *Proteobacteria* fue significativamente mayor ($P=0,026$) en las vaquillonas del grupo **Vs** comparada con las del grupo **Via**. En este último grupo se observó que las abundancias relativas

fueron significativamente mayores para *Tenericutes* (P=0,0202) y *Fusobacteria* (P=0,0007) con respecto a las muestras de los otros dos grupos (Vs y Vp). Además, se observó un efecto significativo del protocolo de sincronización sobre la conformación de las microbiotas, ya que la abundancia de *Actinobacteria* fue significativamente mayor (P=0,0104) en los grupos Via y Vp con respecto a Vs (Figura 11).

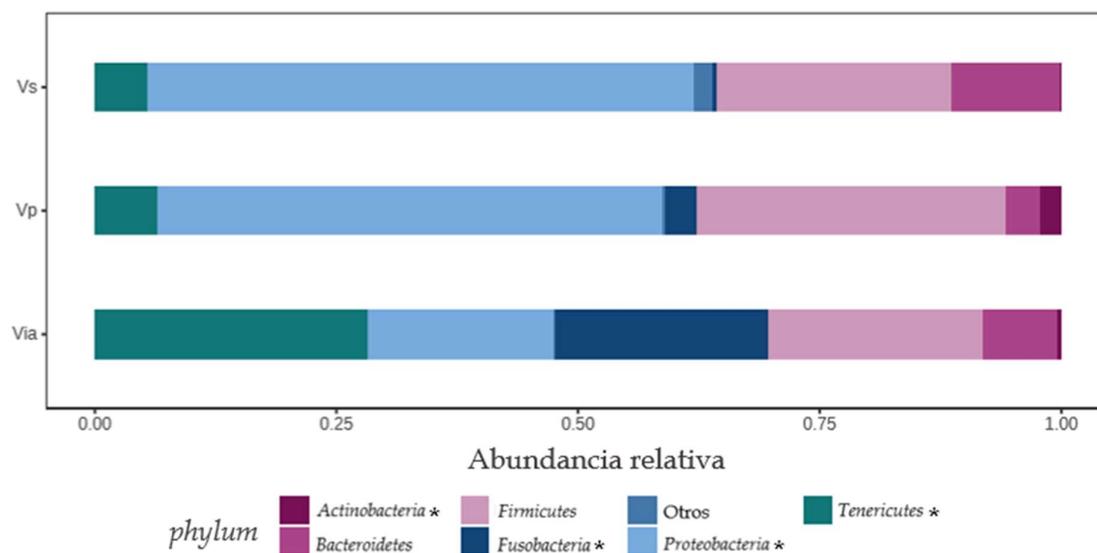


Figura 11. Perfiles de abundancia relativa a nivel de *phylum* obtenidos a partir de la clasificación de secuencias del gen 16S ARNr. **: indica diferencias significativas (P<0,01; prueba de suma de rangos de Wilcoxon) entre los grupos de vaquillonas Braford Via, Vp y Vs.

4.1.3-B COMPARACIONES SEGÚN EL MENOR NIVEL TAXONÓMICO ASIGNADO

El análisis de la distribución a nivel del último taxón asignado por el *pipeline* QIIME evidenció 304 taxones en todas las muestras. Así, *Enterobacteriaceae* (25,4%) fue el taxón más abundante, seguido de *Ureaplasma* (13%), *Pasteurellaceae* (7%), *Leptotrichiaceae* (6%) y *Ruminococcaceae* (5,7%). Además, *Porphyromonas* (1,6%), *Fusobacterium* (1,3%) y *Helcococcus* (0,6%) fueron el onceavo, decimosexto y veintiseisavo taxón más prevalentes, respectivamente.

Los cambios de abundancia relativa del menor taxón bacteriano encontrado (30 taxones más prevalentes) se compararon entre los grupos estudiados, mediante la prueba de Wilcoxon (**Figura 12**). Así, se observaron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre las vaquillonas muestreadas ya que la abundancia del orden *Bacteroidales* ($P=0,0104$), y dentro de este el género *5-7N15* ($P=0,0019$), así como de las familias *Ruminococcaceae* ($P=0,0288$), *Enterobacteriaceae* ($P=0,0015$) y *Rikenellaceae* ($P=0,055$) fue mayor en **Vs** en relación a los otros 2 grupos animales. Las frecuencias relativas de las familias *Pasteurellaceae* ($P=0,0077$), *Leptotrichiaceae* ($P=0,0002$) así como de los géneros *Ureaplasma* ($P=0,0176$), *Fusobacterium* ($P=0,0014$) y *Prevotella* ($P=0,0180$) fueron significativamente mayores en las muestras del grupo **Via** al comparar los resultados entre los 3 grupos. El género *Helcococcus* mostró una mayor abundancia relativa ($P=0,0204$) en las vaquillonas sincronizadas (**Via** y **Vp**) con respecto a las vírgenes (**Vs**). Asimismo, la familia *Lachnospiraceae* presentó una abundancia relativa significativamente menor ($P=0,0302$) en **Vp** mientras que el resultado opuesto fue observado para el género *Bacillus* en **Vp** ($P=0,0079$).

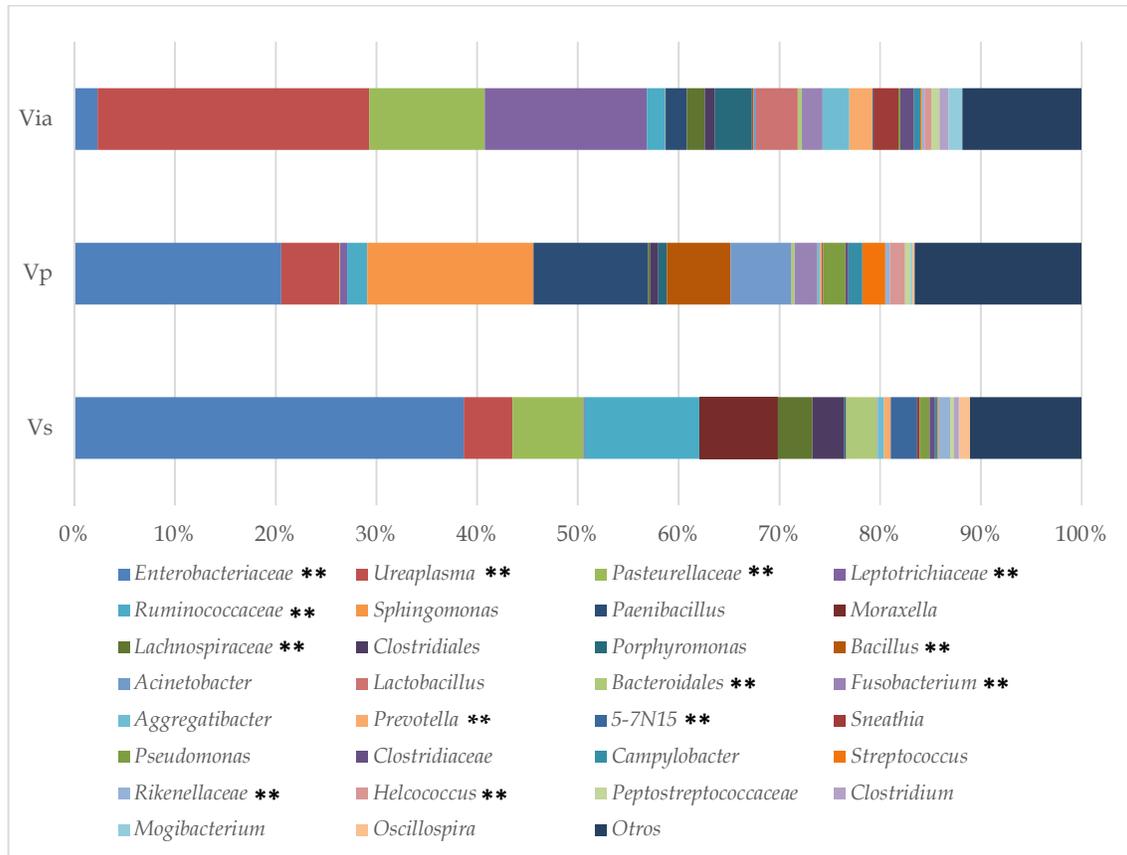


Figura 12. Abundancia relativa del menor nivel taxonómico asignado. Se muestran los 30 grupos taxonómicos más prevalentes. **: indica diferencias significativas ($P < 0,05$; prueba de suma de rangos de Wilcoxon) entre los grupos de vaquillonas Braford Via, Vp y Vs.

**COMUNIDADES MICROBIANAS DEL TRACTO REPRODUCTOR EN GANADO
DE TAMBO: VACAS CON TRASTORNOS REPRODUCTIVOS Y VAQUILLONAS
SANAS**

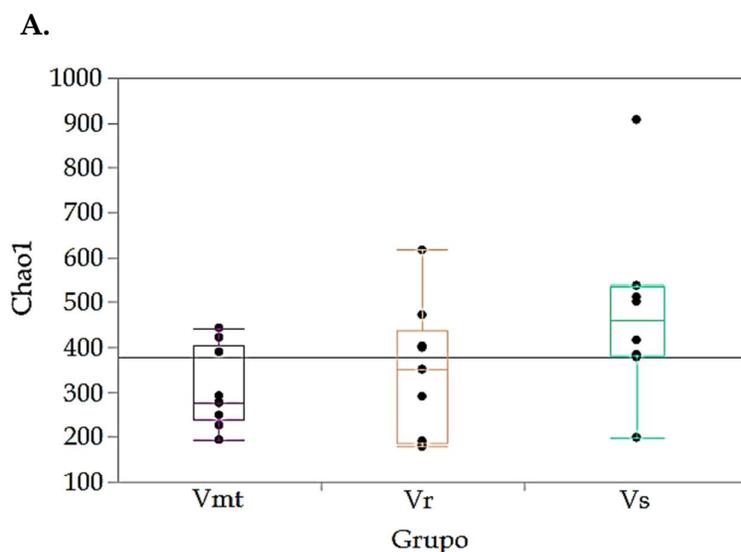
**4.2. ENSAYO 2: POBLACIONES BACTERIANAS DEL ECOSISTEMA VAGINAL
EN VAQUILLONAS SANAS, VACAS CON METRITIS Y CON SÍNDROME DE
VACA REPETIDORA**

En esta etapa del trabajo experimental se utilizaron los grupos de animales: **Vs**, **Vr** y **Vmt** descritos en el ítem 2.1.1.

**4.2.1 ANÁLISIS METAGÉNICO DE LA COMUNIDADES BACTERIANAS
VAGINALES**

La secuenciación de la región V4 del gen bacteriano 16S ARNr de muestras vaginales de vaquillonas y vacas de tambo resultó en la obtención de 2.713 lecturas, con un promedio de 96 lecturas por muestra después de filtrar en base a la calidad de las mismas (la rarefacción se realizó en QIIME).

Al analizar los índices de riqueza y diversidad no se observaron diferencias significativas ($P < 0,01$; test de Wilcoxon) tanto en el índice Chao1 como Shannon entre los grupos **Vmt**, **Vr** y **Vs** (Figura 13). Sin embargo, se evidenció un menor índice de Shannon en el grupo **Vmt**.



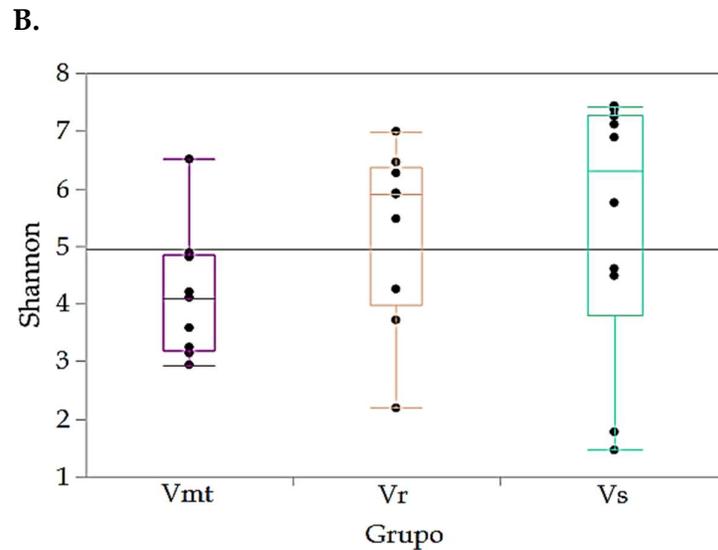


Figura 13. Estimación de la α -diversidad. La riqueza calculada con el índice Chao1 (A) y la diversidad de especies según Shannon (B). Vaquillonas sanas (Vs), vacas con metritis (Vmt) y vacas repetidoras de celo (Vr) de rodeos de tambo.

Seguidamente se realizó el PCoA basado en la disimilitud de Bray-Curtis de la abundancia relativa de *phylum* bacterianos en vaquillonas sanas y vacas con trastornos reproductivos. Se observó una diferencia significativa ($P < 0,001$, PERMANOVA) entre las estructuras de las comunidades microbianas vaginales de los tres grupos: Vs, Vmt y Vr. Sin embargo, la gráfica (Figura 14) muestra mayor superposición entre los datos de las muestras de Vmt y Vr, los cuales tienen mayor disimilitud con los del grupo Vs.

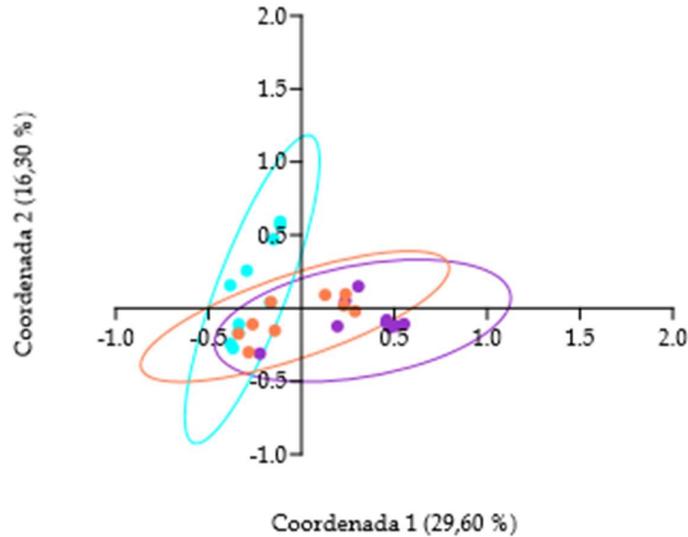


Figura 14. PCoA de la disimilitud de Bray-Curtis para todos los animales de los grupos **Vr** (Coral), **Vs** (aqua) y **Vmt** (violeta), basada en la abundancia bacteriana del nivel de *phylum* ($P < 0,001$; PERMANOVA).

4.2.1-A COMPARACIONES A NIVEL DE *PHYLUM*

Para realizar una aproximación del efecto de los trastornos reproductivos sobre la composición de las comunidades vaginales de hembras de tambo, se realizó el análisis hasta el nivel de *phylum* bacteriano a partir de los datos metagénicos. Los *phylum* más abundantes en vagina de todas las hembras muestreadas fueron seis sobre un total de 10, lo que representa el 98,4% de las comunidades bacterianas: *Firmicutes* (32,5%), *Bacteroidetes* (27,4%), *Proteobacteria* (17,2%), *Tenericutes* (13,2%), *Fusobacteria* (7,2%) y *Actinobacteria* (1%).

La frecuencia relativa de *Fusobacteria* ($P=0,0239$) y *Bacteroidetes* ($P=0,034$) fue significativamente mayor (Wilcoxon, $P < 0,01$) en las vacas con enfermedad uterina (**Vmt**); *Proteobacteria* ($P=0,002$) lo fue en muestras de vacas **Vr** y *Tenericutes* ($P=0,0005$) en las vaquillonas sanas (**Vs**), lo que se muestra en la **Figura 15**.

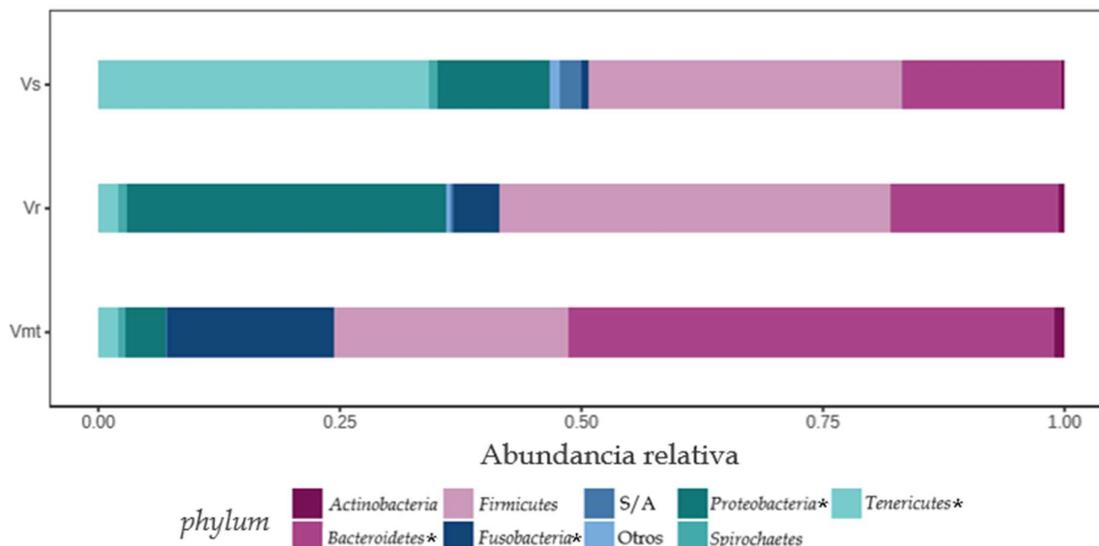


Figura 15. Perfiles de abundancia a nivel de *phylum* obtenidos a partir de la clasificación de secuencias del gen 16S ARNr. La prueba de suma de rangos con signo de Wilcoxon se usó para probar la significación entre los grupos de hembras lecheras **Vr**, **Vs**, **Vmt** (** $P < 0,01$). **S/A**: sin asignar taxón.

4.2.1-B COMPARACIONES SEGÚN EL MENOR NIVEL TAXONÓMICO ASIGNADO

Un total de 304 taxones fueron encontrados, con una mayor prevalencia de *Ureaplasma* (13%), *Porphyromonas* (10,8%), *Ruminococcaceae* (9,1%), *Fusobacterium* (5,7%), *Pasteurellaceae* (2,8%) y *Enterobacteriaceae* (3,9%). A continuación, se comparó la abundancia relativa de los 30 taxones más prevalentes entre los grupos (prueba de rango con signo de Wilcoxon) (**Figura 16**). En el análisis estadístico se observaron diferencias significativas entre los 3 grupos de animales muestreados. Así, en el grupo **Vs** se observó una mayor prevalencia de las familias *Rikenellaceae* ($P=0,0174$) y *Desulfovibrionaceae* ($P=0,0466$) así como de los géneros *Ureaplasma* ($P=0,0006$), *Acinetobacter* ($P=0,0092$), *CF231* ($P=0,0272$) perteneciente a la familia *Paraprevotellaceae*, *Methylobacterium* ($P=0,0026$) y *Oscillospira* ($P=0,012$) con respecto a los otros dos grupos. Por su parte, solo hubo diferencias significativas en la abundancia relativa en **Vs** con respecto a **Vmt** tanto en el orden *Bacteroidales* ($P=0,0155$) y dentro de este específicamente en el género *5-7N15* ($P=0,0107$) de la familia *Bacteroidaceae*, como en las familias *Ruminococcaceae* ($P=0,0339$), *Lachnospiraceae* ($P=0,0175$) y en el género *Bacillus* ($P=0,0085$) perteneciente a la familia

Bacillaceae. En el grupo **Vmt** encontramos una frecuencia relativa significativamente mayor de los géneros *Helcococcus* ($P=0,0013$), *Fusobacterium* ($P=0,0177$) y *Bacteroides* ($P=0,0012$) con respecto a **Vs** y **Vr**; mientras que el resultado inverso fue observado para la familia *Ruminococcaceae* ($P=0,0339$) y para el género *Staphylococcus* ($P=0,0323$). Asimismo, el género *Porphyromonas* ($P=0,0002$) fue significativamente mayor en las muestras de vacas con trastornos reproductivos (**Vmt** y **Vr**) al compararlo con **Vs**. Además, la familia *Pasteurellaceae* presentó significativamente una mayor abundancia relativa en **Vr** en relación con los otros grupos.

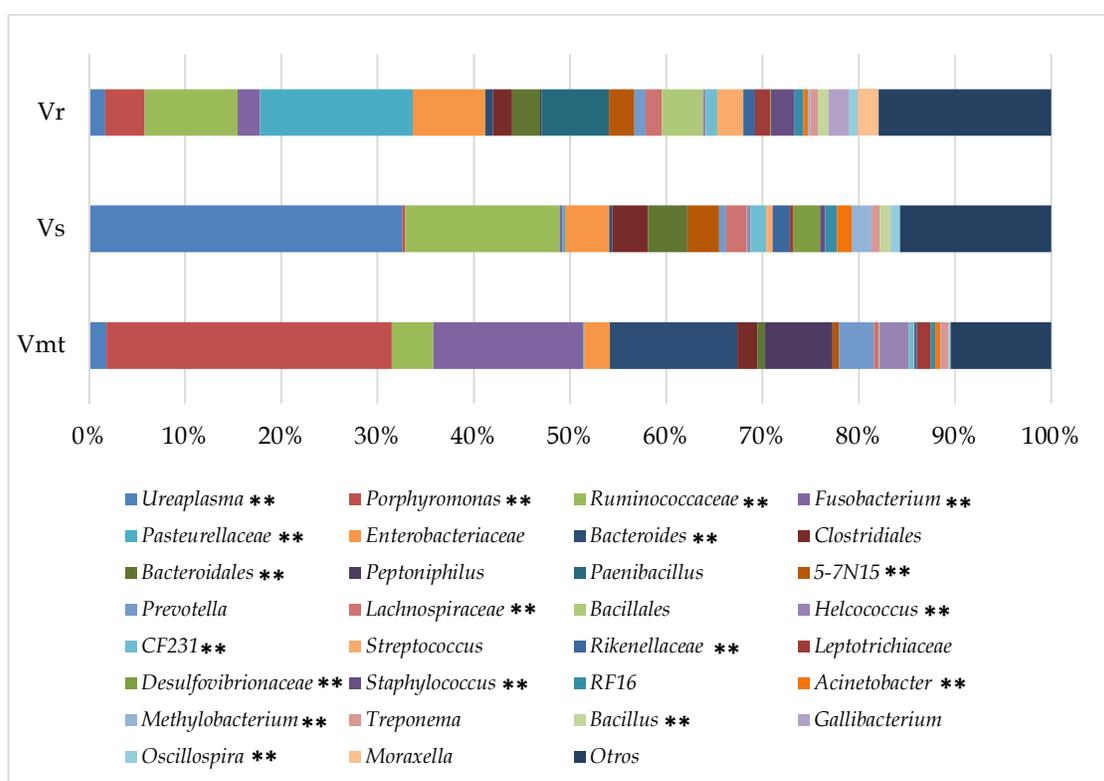


Figura 16. Abundancia relativa del menor taxón bacteriano asignado en muestras de vacas y vaquillonas de tambo. Solo se incluyen los 30 taxones con mayor prevalencia. La prueba de suma de rangos con signo de Wilcoxon se usó para probar la significación entre los grupos **Vr**, **Vs** y **Vmt** (** $P<0,05$).

5. DISCUSIÓN

La microbiota asociada al TRB, particularmente la que coloniza útero, ha sido objeto de numerosos estudios en las vacas lecheras sanas y en aquellas con trastornos uterinos en el posparto temprano (Machado y col., 2012; Santos y col., 2011; Bicalho y col. 2017b; Jeon y col., 2015, 2016). Recientemente, se ha comenzado a analizar la composición de los consorcios microbianos en vagina de vacas pertenecientes tanto a rodeos de carne como de leche (Laguardia-Nascimento y col., 2015; Wang y col., 2016; Bicalho y col., 2017a; Clemmons y col., 2017). Hasta el presente no se registran trabajos científicos que, utilizando técnicas independientes de cultivo, analicen el efecto de un protocolo de sincronización de ovulación para IATF sobre la composición de las comunidades bacterianas vaginales en vaquillonas de carne. Si bien Clemmons y col. (2017) estudiaron la microbiota uterina y vaginal el día de la IA, su estudio fue realizado en vacas en posparto de raza Angus y no vaquillonas, como se evalúa en el presente trabajo de tesis. Además, el mencionado estudio no incluyó el uso de PRID en la sincronización del estro y sólo tomaron muestras el día de la IA, por lo que no les fue posible inferir acerca de los cambios que produce el protocolo de sincronización.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis evidencian cambios en la comunidad microbiana vaginal inducidos por el tratamiento con PRID en vaquillonas de carne. Cabe destacar que si bien la dinámica hormonal del estro en condiciones fisiológicas, afecta al microecosistema vaginal (Otero y col., 1999;2000; Yu y col., 2018), el uso del protocolo de sincronización convencional para IA asegura una situación uniforme del estado hormonal de todas las hembras del grupo, reduciendo las posibles variaciones debido a niveles hormonales y estados fisiológicos variables.

Los estudios dependientes de cultivo indicaron que en vaquillonas del grupo Via (momento en que se debería realizar la IA), la colonización por enterobacterias no siempre acompañó a la de mesófilos, y que hubo mayor desarrollo de α y β -hemolíticos entre los microorganismos mesófilos, indicarían un mayor riesgo de proliferación de potenciales patógenos. Otros estudios, basados también en el cultivo de las muestras de hisopados vaginales, pusieron en evidencia una disbiosis

inducida por el PRID en la microbiota vaginal con alto grado de crecimiento de bacterias patógenas, concluyendo acerca del riesgo que representan para la sanidad del TRB y, por lo tanto, para la fertilidad de las hembras (Padula & Macmillan, 2006; Walsh y col., 2008; Fischer-Tenhagen y col., 2012). Teniendo en cuenta que, en dichos protocolos de sincronización del celo, el PRID colocado en vagina durante 7 días funciona como un cuerpo extraño (que libera progesterona), es de interés analizar la asociación de la disbiosis originada por dicho dispositivo con la inflamación en la mucosa vaginal. Este enfoque no había sido aún realizado en vaquillonas vírgenes utilizando evaluaciones citológicas. Esta situación es particularmente riesgosa ya que las hembras entran en fase de estro (receptivas al macho) 48 horas después que se retira el PRID, momento en el cual el cérvix se encuentra abierto posibilitando el ingreso al útero de microorganismos alojados en vagina. Así, un cuadro de vaginitis que se acompañe de un incremento de poblaciones vaginales potencialmente patógenas adquiere relevancia porque la IA debe realizarse 52 horas luego del retiro del PRID.

En este trabajo de tesis, por primera vez se analiza la vaginitis a través de un score que combina la evaluación citológica y de descarga vaginal, determinada por vaginoscopía. El diagnóstico de vaginitis fue positivo en el 100% de las muestras del grupo **Via** en contraposición a lo informado por Walsh y col. (2007), quienes detectaron un menor porcentaje de vaginitis en vacas lecheras bajo un protocolo de sincronización con PRID, pero aplicando un score de vaginitis basado exclusivamente en la observación del tipo de mucosidad presente en el dispositivo intravaginal en el momento de su retiro. Los resultados indican que la observación de la descarga y/o la exploración vaginoscópica por sí solas, carecen de suficiente sensibilidad para realizar el diagnóstico de vaginitis. Nuestra experiencia demuestra que muestras sin DV pueden tener un diagnóstico de vaginitis positiva con preparados “sucios” con detritus y abundantes leucocitos en entramados de fibrina (NET).

A pesar que diversos trabajos han estudiado la alteración de las poblaciones microbianas debido a la utilización del protocolo de control del ciclo estral, no se registran estudios que evalúen dichos cambios mediante técnicas independientes de

cultivo (PCR-DGGE y metagénica), como el que se abordó en este trabajo de tesis. Así se detectó en el momento de la IA (día 11 del protocolo), que las comunidades microbianas vaginales presentan un patrón característico (las muestras **Via**, excepto una, se agruparon en dos clústeres), además el diagnóstico de vaginitis fue positivo en todas ellas. Una situación diferente se detectó a los 60 días del protocolo, en que sólo el 50% de los hisopados fueron vaginitis positiva y todas las muestras se agruparon en un único *cluster*, distinto de los del grupo **Via**. La inflamación en el TRB en el momento de la IA constituye un factor de riesgo para el éxito de la preñez, según lo descrito por Pascottini y col. (2016a). Estos autores evaluaron la inflamación uterina mediante citología en el momento de la IA de vacas lecheras de raza Holstein-Friesian, concluyendo que la inflamación puede desencadenar una serie de respuestas en el tracto que comprometen la viabilidad de las gametas y también la del embrión, lo que explicaría la fuerte asociación entre la baja tasa de preñez y la inflamación detectada al momento de la IA. Cabe destacar que dicho grupo de investigación estandarizó un valor de *cut-off* de $PMN \geq 1\%$ para el diagnóstico de inflamación durante la IA (Pascottini y col., 2016a; 2016b), por lo que sus hallazgos son aún más significativos. En este contexto, también nuestras observaciones cobran significancia y, además, ponen de manifiesto que la inflamación de la mucosa está asociada a un cambio del ecosistema del tracto. Esta situación ha sido ampliamente estudiada en mujeres, en las cuales se reportó que alteraciones de la microbiota vaginal normal se relacionan con enfermedades inflamatorias pélvicas, abortos espontáneos y partos prematuros (DiGiulio y col., 2015; Nelson y col., 2015; Lewis y col., 2017).

Si bien, la diversidad de especies según el índice Shannon fue similar en los tres grupos de animales, la microbiota vaginal de las vaquillonas en el día 11 del protocolo (**Via**), exhibió menor riqueza (estimada mediante índice Chao1) en relación con las vaquillonas sanas (**Vs**) y las del grupo **Vp** (día 60); probablemente el cambio en la microbiota fue inducido por el protocolo de sincronización y luego, la riqueza se recuperó en un período post-sincronización restableciendo un estado basal, que en este estudio, se correspondería con las muestras **Vs**. Al no haber sido inseminadas, las vaquillonas **Vp** tuvieron probablemente mayor posibilidad de

recuperar su microbiota vaginal. Una menor riqueza de especies en la microbiota vaginal puede representar un riesgo para la sanidad del tracto, lo que es aún más relevante si ocurre en el momento de la IA. Numerosos trabajos han reportado la pérdida de diversidad en la microbiota uterina de vacas y el desarrollo de la enfermedad uterina posparto, al compararlas con las de vacas posparto sanas (Jeon y col., 2015; Jeon & Galvão, 2018; Sicsic y col., 2018). Además de la pérdida de riqueza, se detectó una preferencia por los *phylum Fusobacteria* y *Tenericutes* en el día de la IA (muestras **Via**). El análisis de la prevalencia bacteriana a nivel de *phylum* detectada por PCR-DGGE indicó que las muestras pertenecieron mayoritariamente a los *phylum Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Proteobacteria*, con menor frecuencia se detectó *Actinobacteria*. Además, en el análisis metagénico, se obtuvieron secuencias compatibles con *Tenericutes* y *Fusobacteria*. Además, los resultados del análisis de la asociación entre la sincronización y la prevalencia de los *phylum Actinobacteria*, *Bacteroidetes* y *Firmicutes* coinciden en ambas técnicas moleculares, no así lo observado respecto de *Proteobacteria*. Dicha diferencia en los resultados al utilizar estas dos técnicas puede deberse a que la metagénica tiene un enfoque más preciso para la evaluación de la composición taxonómica (Simon & Daniel, 2011). Se ha reportado que el empleo de tecnologías de secuenciación de última generación, como la secuenciación metagenómica de amplicones del gen 16S ARNr, proporciona una profundidad de muestreo sin precedentes en comparación con los enfoques tradicionales, como la técnica de DGGE (von Mering, 2007). Cabe destacar que en el presente trabajo para el estudio metagénico, se utilizó una secuenciación de alto rendimiento en la plataforma de MiSeq de Illumina, que es una de las más robustas para la investigación de las poblaciones microbianas asociadas con la salud y la enfermedad, validada además para muestras de vagina bovina (Bicalho y col., 2017a). Además, nuestros resultados coincidieron respecto de la conformación de la microbiota vaginal bovina a nivel de *phylum*, con lo publicado por este grupo de investigación.

El análisis metagénico en un nivel taxonómico menor evidenció la detección del género *Staphylococcus* en todos los grupos de vaquillonas y sin diferencias significativas, también ha sido descrito como integrante la microbiota vaginal

nativa de vaquillonas y vacas sincronizadas (Otero y col., 2000; Clemmons y col., 2017).

De acuerdo con un reporte sobre la diversidad microbiana en vacas posparto, *Porphyromonas* y otros anaerobios relacionados colonizan el TRB (Machado y col., 2012). De manera similar, en el presente trabajo, *Porphyromonas* fue identificado en todos los grupos analizados por ambas técnicas independientes de cultivo. Probablemente exista como un patógeno oportunista, ya que otros estudios han informado que este género ha sido frecuentemente aislado de infecciones del TRB y de membranas fetales retenidas en vacas (Drillich y col., 2001; Blum y col., 2012), pudiendo tener un rol importante en el desarrollo de la metritis posparto (Wagener y col., 2014; Jeon y col., 2015). Nuevas investigaciones son necesarias para estudiar si microorganismos que normalmente habitan la vagina se comportan como patógenos oportunistas que son capaces de afectar la fertilidad en el momento de la IA.

En concordancia con lo observado a nivel de *phylum*, diferencias significativas de ciertos taxones se evidenciaron en relación con el grupo muestreado como consecuencia de la sincronización de las vaquillonas. Así, la aplicación del PRID indujo una disbiosis vaginal en el grupo **Via** donde prevalecieron patógenos uterinos reconocidos como *Fusobacterium* y *Prevotella* (Bicalho y col., 2017b; Jeon & Galvão, 2018), emergentes como *Helcococcus* (Machado y col., 2012; Jeon y col., 2015; Jeon & Galvão, 2018) y *Leptotrichiaceae* (Knudsen y co., 2016), y también *Pasteurellaceae*, previamente reportado como patógeno oportunista del TRB (Bicalho y col., 2017a). Los resultados evidenciaron que *Helcococcus* presentó una abundancia significativamente mayor en aquellas provenientes de vaquillonas bajo el protocolo de sincronización (**Via** y **Vp**). Si se tiene en cuenta que este género bacteriano fue propuesto como una causa novedosa de aborto bovino y metritis puerperal (Locatelli y col., 2013; Animal Health and Veterinary Laboratories Agency's: AHVLA Disease Surveillance Report, 2014; Cunha y col., 2018), su presencia en vagina puede ser considerado un factor de riesgo para la fertilidad de las hembras bovinas.

Respecto de los taxones asociados al grupo **Vs** se pudo destacar la familia *Enterobacteriaceae* que, además fue el taxón de mayor prevalencia en concordancia con lo reportado previamente por Otero y col. (2000), quienes estudiaron la

microbiota nativa de vagina bovina mediante técnicas dependiente de cultivo y describieron a *E. coli* como integrante normal de la misma, tanto en vaquillonas como en vacas adultas. Las familias *Ruminococcaceae* y *Rikenellaceae* así como el género *5-7N15*, fueron detectados también en este grupo de vaquillonas (**Vs**), siendo estos 3 taxones previamente descritos como integrantes de la microbiota vaginal normal de vacas de carne (Laguardia-Nascimento y col., 2015; Clemmons y col., 2017).

Por todo lo expuesto en esta etapa es posible inferir que el protocolo de sincronización de estro estudiado, que incluye la colocación de un PRID, modifica el ecosistema vaginal ocasionando una disbiosis acompañada de inflamación. Así, microorganismos patógenos del TRB se seleccionan en vagina en el día 11 del protocolo, momento en que se debería realizar la IA, lo que podría permitir que colonicen el útero y afecten la fertilidad de las vaquillonas de carne.

En el segundo ensayo se realizó el análisis metagénico de la comunidad microbiana de vagina presente en hembras bovinas lecheras. Si bien un trabajo científico previo ha descrito la microbiota vaginal de vacas lecheras postparto sanas y con metritis (Bicalho y col., 2017a); hasta nuestro conocimiento, no se registran publicaciones que, utilizando técnicas independientes de cultivo, analicen la composición de comunidades bacterianas vaginales de vacas lecheras que presenten el síndrome de vaca repetidora (**Vr**) y las compare, a su vez, con vacas con enfermedad uterina posparto (**Vmt**) y vaquillonas sanas (**Vs**). Así, en el presente trabajo de tesis, se pudo observar que los perfiles de la comunidad bacteriana de vagina fueron divergentes entre sí, con presencia de patógenos uterinos reconocidos asociados a **Vmt** y en menor medida a **Vr**.

Contrariamente a lo observado en las vaquillonas de carne, en las hembras de tambo la riqueza y diversidad microbiana vaginal (índices Chao1 y Shannon) no difirieron significativamente entre vaquillonas sanas y vacas enfermas (**Vmt** y **Vr**). Bicalho y col. (2017a) también observaron que la diversidad fue similar en vacas sanas y enfermas cuando evaluaron las comunidades bacterianas vaginales de vacas de tambo en posparto. Sin embargo, un estudio reveló que la microbiota uterina de vacas lecheras métricas presenta ambos índices reducidos (Jeon y col., 2017). Es

probable que la dinámica de ambos nichos (vagina y útero) responda de manera diferente a las distintas situaciones de la hembra. Además, debe tenerse en cuenta que existe una relación entre el fenotipo del hospedador y la presencia, abundancia y diversidad de diferentes comunidades bacterianas en muchas especies animales (Le Chatelier y col., 2013; Jami y col., 2014; Romero y col., 2014).

Mediante el análisis de PCoA se observó que las comunidades bacterianas de las vacas con trastornos reproductivos (**Vmt** y **Vr**) fueron relativamente similares diferenciándose de las vaquillonas sanas (**Vs**), lo que puede implicar que el cambio en la población microbiana vaginal sea un factor de riesgo de enfermedad uterina en el posparto temprano y tardío. Se ha demostrado que si hay patógenos colonizando vagina; éstos pueden llegar fácilmente a útero y causar enfermedad cuando el cuello uterino, que sirve como barrera anatómica, se abre durante el parto (Sheldon & Dobson, 2004; Jeon y col., 2017).

En cuanto a la composición de las comunidades microbianas vaginales, *Bacteroidetes* y *Fusobacteria* son significativamente más prevalentes en **Vmt**, mientras que *Proteobacteria* lo estuvo en el grupo **Vr**. Estos tres *phylum* han sido asociados con enfermedades uterinas posparto (Santos y Bicalho, 2012; Jeon y col., 2015; Bicalho y col. 2017b). Los resultados de esta tesis describen por primera vez, el perfil microbiano vaginal en hembras con SVR de celo; por lo que la asociación entre *Proteobacteria* y este grupo cobra especial relevancia ya que dicho *phylum* no solo está implicado en las afecciones uterinas posparto, sino ha sido asociado vulvovaginitis necrótica bovina (Elad y col., 2004).

El análisis del menor nivel taxonómico observado permitió diferenciar los taxones más abundantes en vaginas de vaquillonas sanas y vacas con trastornos reproductivos (**Vmt** y **Vr**). Así, *Porphyromonas* fue significativamente mayor en las vacas con trastornos reproductivos (VTR) al comparar con **Vs**. Como se mencionó previamente, este género bacteriano ha sido descrito por su implicancia en la metritis posparto (Wagener y col., 2014; Jeon y col., 2015) y en la vulvovaginitis necrótica bovina (Elad y col., 2004), por lo que su presencia en vagina de hembras con problemas de fertilidad es de gran importancia. En consecuencia, su posible rol en la patogénesis del SVR debe ser estudiado con mayor profundidad.

La familia *Pasteurellaceae* estuvo asociada significativamente a las muestras de vacas repetidoras de celo. Integrantes de esta familia, como el género *Gallibacterium*, fue descrito por Bicalho y col. (2017a) en las muestras vaginales de vacas de tambo pre y posparto. Estos autores además reportaron que integrantes de esta familia han sido considerados como patógenos oportunistas del tracto genital bovino. El perfil de la microbiota vaginal en vacas repetidoras de celo debe ser tenido en cuenta como un posible factor implicado en la patogenia de dicho síndrome.

Los géneros *Bacteroidetes*, *Fusobacterium* y *Helcococcus* se asociaron significativamente con el grupo **Vmt**, en concordancia con reportes previos que implican a estos microorganismos en la patogénesis de la metritis posparto (Knudsen y col., 2016; Jeon y col., 2015; 2017; Cunha y col., 2018). Se ha propuesto que una disbiosis, producto de un aumento agudo y significativo de estos grupos bacterianos, en el posparto contribuyen a la infección uterina (Jeon & Galvão, 2018). Asimismo, como se mencionó previamente, el género *Helcococcus* fue reportado recientemente como causante de aborto bovino, acompañado de sepsis (AHVLA Disease Surveillance Report, 2014).

En estudios dependientes de cultivo, *Escherichia coli* ha sido descrita como el principal agente patógeno responsable de iniciar la infección uterina posparto, lo que altera el equilibrio natural de la microbiota uterina para favorecer la presencia de bacterias anaerobias oportunistas como por ejemplo, *Bacteroides*, *Fusobacterium* y *Trueperella* (Bicalho y col., 2010; Sheldon y col., 2010; Jeon & Galvão, 2018). Sin embargo, en el presente estudio, las secuencias relacionadas con *Enterobacteriaceae* se observaron en muestras de los tres grupos sin diferencias significativas entre ellos si bien es uno de los taxones más abundantes. Asimismo, la presencia de *E. coli* rara vez ha sido puesta de manifiesto en el útero de vacas lecheras con metritis utilizando análisis de secuenciación metagenómico (Jeon y col., 2015). Este resultado conflictivo puede ser debido a la diversidad de cepas de *E. coli* (Jeon & Galvão, 2018). Se ha reportado la existencia de una cepa particular de *E. coli* con mayor potencial de adherencia e invasión al endometrio bovino (*E. coli* patógena endometrial: EnPEC) (Sheldon y col., 2010; Bicalho y col., 2010; Bicalho y col., 2012; Kassé y col., 2016). En cambio, se observó una asociación significativa entre *Trueperella* y el grupo de vacas

con enfermedad uterina (**Vmt**), aunque su prevalencia fue baja. Siendo *E. coli* y *Trueperella pyogenes* son especies altamente asociadas con trastornos uterinos en el posparto de vacas lecheras (Jeon y col., 2015, Bicalho y col., 2017a; Cunha y col., 2018; Jeon & Galvão, 2018) se ha planteado que quizás la presencia de factores intrínsecos de dichas bacterias sea más relevante para el desarrollo de la enfermedad uterina que su abundancia (Bicalho y col., 2012). Por ejemplo, en estudios previos se observó que la enfermedad uterina está asociada con la presencia de factores de virulencia específicos, como *fim A* en *T. pyogenes* (Santos y col., 2010) o *fim H* (Bicalho y col., 2010) y *fyuA* (Sheldon y col., 2010) en *E. coli*.

Por otro lado, la abundancia relativa tanto de la familia *Ruminococcaceae* como del género *Staphylococcus* fue menor en vagina de vacas con enfermedad uterina. Si bien, estos taxones han sido reportados en vagina de vacas lecheras posparto, su presencia no tuvo relevancia clínica (Bicalho y col. 2017a). Asimismo, como se mencionó previamente en las vaquillonas del primer ensayo, el género *Staphylococcus* es un comensal de vagina de las hembras bovinas (Otero y col., 2000; Clemmons y col., 2017).

Teniendo en cuenta que algunas bacterias pueden ser responsables de mantener un equilibrio ecológico que mantiene la salud de la vagina y que a su vez podrían promover un útero sano (Clemmons y col., 2017), es interesante estudiar aquellos taxones con abundancia relativa significativamente mayor en vagina de vaquillonas sanas. De esta manera, los resultados obtenidos en la presente tesis coinciden con reportes previos donde se describió a las familias *Lachnospiraceae* y *Rikenellaceae* así como a los géneros *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Oscillospira*, *Ureaplasma*, CF231 de la familia *Paraprevotellaceae* y 5-7NS de la familia *Bacteroidaceae*, como parte de la microbiota comensal de hembras bovinas (Laguardia-Nascimento y col., 2015; Bicalho y col. 2017a; Clemmons y col., 2017). Por su parte, la familia *Desulfovibrionaceae* y el género *Methylobacterium* no han sido previamente identificados en muestras de vagina bovina. Siendo *Desulfovibrionaceae* una familia de bacterias anaerobias reductoras de sulfato recientemente descrita en el rumen de bovinos de carne (Wu y col., 2012), su implicancia en el equilibrio del TRB debe ser estudiada con mayor profundidad. El género *Methylobacterium* incluye un grupo de

bacterias Gram negativas estrictamente aeróbicas que se detectan en el suelo, agua dulce y sedimentos lacustres (Bracke y col., 2014). Además, se ha informado que esta bacteria causa infecciones oportunistas en personas inmunocomprometidas (Sanders y col., 2000). Recientemente, *Methylobacterium* también fue observada como un contaminante en muestras de leche bovina (Bracke y col., 2014; Kano y col., 2018), sin embargo la bibliografía no es clara acerca de su rol en la patogénesis de la mastitis bovina ya que Pang y col. (2018) no observaron asociación entre *Methylobacterium* y dicha enfermedad, lo que sugiere que este microorganismo ambiental podría actuar como patógeno oportunista.

Los resultados obtenidos en esta etapa de tesis demostraron que la microbiota vaginal bovina de hembras raza Holando Argentino varía según el perfil clínico-reproductivo de las mismas. Tanto las vacas con enfermedad uterina como las repetidoras de estro están colonizadas por patógenos del TRB, por lo que su presencia en vagina puede ser clasificada como un factor de riesgo para la fertilidad de las vacas.

6. CONCLUSIONES PARCIALES

Los resultados de esta etapa permiten concluir que:

- El diagnóstico de vaginitis debe hacerse en base a la evaluación citológica, incrementando la sensibilidad de la simple exploración vaginoscópica de la mucosa y su descarga.
- El protocolo de sincronización de celo con PRID indujo cambios en las comunidades bacterianas en vagina de vaquillonas generando perfiles de la microbiota diferentes de las de vaquillonas no sincronizadas.
- Los cambios generados incluyen pérdida de la riqueza microbiana, así como la presencia de poblaciones potencialmente patógenas en el momento de la IA, tales como la familia *Pasteurellaceae* y los géneros *Fusobacterium*, *Leptotrichiaceae* y *Prevotella*.
- Por primera vez se describe el perfil microbiano vaginal asociado al SVR, con una estructura poblacional bacteriana característica y diferente de la de vaquillonas sanas. Incluyendo combinaciones de microorganismos patógenos uterinos reconocidos, tales como la familia *Pasteurellaceae* y el género *Porphyromonas*.



CAPÍTULO 2

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE *Escherichia coli*
AUTÓCTONAS DE HEMBRAS BOVINAS CON
DIFERENTES CONDICIONES CLÍNICO-
REPRODUCTIVAS**

Méd. Vet. Candelaria Gonzalez Moreno

1. INTRODUCCIÓN

Escherichia coli es la especie predominante de la microbiota aerobia y anaerobia facultativa del tracto gastrointestinal de los animales endotermos y reptiles (Berg 1999; Gordon & Cowling, 2003). Este microorganismo es capaz, además, de colonizar otros sitios anatómicos (Köhler & Dobrindt, 2011), como ser el TR. En este sentido, se ha descrito que forma parte de las poblaciones nativas de vagina de vaquillonas y vacas adultas sanas (Otero y col., 2000).

La mayoría de las cepas de *E. coli* que residen en las mucosas de intestino y el TR bovino (TRB) son comensales (Gyles & Fairbrother, 2010; Otero y col., 2000); sin embargo, se ha propuesto que cepas altamente adaptadas pueden adquirir factores de virulencia (FV) específicos los cuales les permiten causar un amplio espectro de enfermedades; dichos factores incluyen: adhesinas, toxinas, sideróforos y componentes de sistemas de secreción, entre otros (Kaper y col., 2004). Estos atributos de virulencia no son necesarios para el comensalismo, pero permiten el establecimiento de la enfermedad ya que favorecen la colonización de superficies específicas del hospedador, así como la evasión del sistema inmune o el daño celular directo (Johnson & Russo, 2002). Los mismos están codificados frecuentemente en elementos genéticos móviles los que favorecen el movimiento entre diferentes cepas para crear nuevas combinaciones de FV. Sólo aquellas más exitosas de dichos FV han persistido para convertirse en “patotipos” de *E. coli*, capaces de causar enfermedad en individuos sanos. De esta manera, en función del tipo de infección que producen, los patotipos de *E. coli* se clasificaron como intestinales o extraintestinales (Kaper y col., 2004).

Los patotipos intestinales más importantes en animales son *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC) y *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) (Gyles y col., 2010). Si bien, STEC forma parte de la microbiota intestinal normal del ganado y otros rumiantes es altamente patógena en humanos.

Por su parte, las cepas de *E. coli* extraintestinales (ExPEC) engloban cepas aisladas de infecciones fuera del intestino e incluyen: *E. coli* asociada a meningitis

neonatal (NMEC), *E. coli* causante de sepsis (SEPEC), *E. coli* uropatógena (UPEC) y *E. coli* patógena aviar (APEC). (Johnson & Stell, 2000; Johnson & Russo, 2002, 2005; Smith y col., 2007, Bélanger y col., 2011; Clermont y col., 2011; Ewers y col., 2007; Johnson y col., 2010; Moulin-Schouleur y col., 2007). Asimismo, *E. coli* necrotoxigénica (NTEC) ha sido descrita como agente causal de diarrea y septicemia en distintas especies de animales, así como de abortos en bovinos y porcinos (Coura y col., 2016). Se han propuesto dos nuevos subgrupos de ExPEC bovinas: *E. coli* patógena endometrial (EnPEC) (Sheldon y col., 2010) y *E. coli* patógena mamaria (MPEC) (Shpigel y col., 2008). Las cepas de ExPEC residen asintóticamente en el intestino de una fracción de hospedadores sanos, pero, una vez que alcanzan los nichos extraintestinales, tienen una capacidad única para colonizarlos eficientemente y causar enfermedad (Kaper y col., 2004; Köhler & Dobrindt, 2011, Vila y col., 2016). *E. coli* altamente adaptadas han adquirido múltiples FV (ausentes en cepas comensales o patotipos intestinales) tales como adhesinas, toxinas, invasinas, polisacáridos de revestimiento y sistemas de captación de hierro (Sannes y col., 2004; Köhler & Dobrindt, 2011). Estos FV abarcan funciones que incluyen adhesión, adquisición de nutrientes, competencia con otros microorganismos, evasión de las defensas inmunológicas del hospedador, así como daño celular o tisular y, por tanto, enfermedad (Kaper y col., 2004; Johnson & Russo, 2005). Así, los distintos subgrupos de ExPEC presentan diferentes combinaciones de FV que participan en la etiología de las infecciones (Kaper y col., 2004).

La **adhesión bacteriana** ha sido postulada como un FV crítico en la colonización exitosa de una mucosa específica. En este sentido, los aislamientos fecales y aquellos aislados de pacientes con cistitis y pielonefritis difieren en su capacidad de adhesión a las células uroepiteliales y vaginales (Wullt y col., 2002). La identificación de los mecanismos subyacentes ha demostrado que *E. coli* expresa diferentes tipos de adhesinas como las fimbrias Dr y Afa, S y P, y las fimbrias tipo 1, que median la unión a receptores o epítopes de receptores presentes en el epitelio.

Así, *E. coli* pueden producir de tres a cuatro fimbrias diferentes, aunque algunas cepas producen solo una y en otros casos no se detecta ninguna (Wullt y col., 2002).

La **fimbria tipo 1**, o “sensible a manosa”, se encuentra en la mayoría de las *E. coli*; sin embargo, en ciertas cepas, puede ser considerada como un FV ya que la interacción entre las estructuras de esta fimbria y el receptor desempeña un papel clave en la colonización de diversos tejidos. De hecho, se ha demostrado que la expresión de dicha fimbria en *E. coli* está vinculada a infecciones del tracto urinario (ITU) en humanos (Schembri y col. 2000) y con metritis posparto en vacas lecheras (Jeon & Galvão, 2018). La **fimbria P** es la adhesina “resistente a la manosa” más importante, aunque la expresa un número limitado de serotipos de *E. coli*; incluidos, principalmente, entre las cepas de UPEC que causan pielonefritis en el hombre (Jadhav y col., 2011). Esta fimbria permite a la bacteria fijarse a los receptores celulares y colonizar el epitelio urinario (Blanco y col., 2002; Emódy y col., 2003). Otra adhesina importante es la **fimbria S** asociada especialmente con cepas NMEC y SEPEC, así como con UPEC (Blanco y col., 2002).

La **fimbria curly**, constituida por una delgada fibra de proteínas en espiral, es producida por algunas cepas de *E. coli*. Su expresión está estrictamente regulada a través de la interacción entre el medio ambiente y factores genéticos, preferentemente durante la inanición, en fase estacionaria de crecimiento, y a temperaturas <30°C; por lo que su presencia en humanos se ha correlacionado con la colonización de la región perineal (Emódy y col., 2003). Dicha fimbria es capaz de mediar la unión a varios sustratos, incluidos la fibronectina y la laminina; además, desempeña un papel importante en la autoagregación bacteriana y formación de biofilm. Su expresión contribuye a la patogénesis de la invasión bacteriana, la colonización y la sepsis (Ryu y col., 2004). La producción de fimbria curly en cepas de *E. coli* es variable y depende del patotipo. Así, por ejemplo, su expresión fue reportada en el 55% de los aislamientos de *E. coli* de mastitis bovina (Olsen y col., 1989) y está presente en aproximadamente el 50% de las cepas UPEC (Emódy y col., 2003).

Las **adhesinas Dr y Afa** pertenecen a una familia de adhesinas de *E. coli* que reconocen al antígeno del grupo sanguíneo Dr como su receptor (Nowicki y col., 2001). La familia Dr incluye adhesinas afimbriales, como AFA-I y AFA-III, otras adhesinas fimbriales como F1845 y la fimbria Dr (Nowicki y col., 2001), siendo estas adhesinas, asociadas a *E. coli* uropatógenicas y diarreagénicas en humanos (Le Bouguenec y col., 2006). En concordancia, se ha reportado la presencia de receptores Dr/Afa en células del colon, tracto urogenital bajo, uréteres y epitelio de la pelvis renal humano (Wroblewska-Seniuk y col., 2005). Asimismo, estos autores postularon que estas adhesinas afimbriales pueden predisponer al establecimiento de infecciones crónicas y/o recurrentes.

La colonización bacteriana es promovida por fenómenos como la agregación bacteriana y la formación de biofilm; en *E. coli* la expresión del **antígeno 43**, una proteína de superficie, contribuye a ambos procesos (Restieri y col., 2007). En este sentido, se ha reportado una mayor prevalencia de secuencias de *agn43* en *E. coli* patógenas, como diarreagénicas, UPEC y APEC, que en cepas comensales (Restieri y col., 2007). La formación de biofilm es también promovida por la movilidad, mediada por flagelos, que facilitan las etapas iniciales de adhesión a materiales abióticos o a células epiteliales (Lindsay & von Holy, 2008).

La colonización que media la infección extraintestinal, implica además de la adhesión, procesos de multiplicación celular; en los que la disponibilidad de nutrientes críticos como el hierro, representa uno de los factores limitantes (Garénaux y col., 2011). Por ello, la mayoría de las ExPEC posee **sideróforos** para poder incorporarlo, los cuales usualmente constan de un compuesto quelante del hierro de bajo peso molecular que es excretado y luego re-captado por la propia bacteria (Blanco y col., 2002; Garénaux y col., 2011). Otra estrategia desarrollada por cepas de *E. coli* implica poner en disponibilidad el hierro en su medio ambiente, produciendo **α -hemolisina**, la cual lisa eritrocitos permitiendo la liberación de hierro y otros nutrientes necesarios para el crecimiento bacteriano (Blanco y col., 2002). Las hemolisinas además, son tóxicas para algunas células del hospedador e

incluyen leucocitos, células epiteliales y endoteliales (Murthy y col., 2018). Así, la frecuencia de aislamiento de *E. coli* hemolítica se asocia significativamente con la gravedad de la infección (Jadhav y col., 2011). Por ejemplo, de las toxinas UPEC conocidas, la α -hemolisina, está presente en aproximadamente el 50% de las cepas UPEC en humanos (Hannan y col., 2008), jugando un papel importante en la patogenia de este patotipo (Welch, 2016).

La adquisición de resistencia a antimicrobianos o las características de virulencia pueden representar ventajas de supervivencia para la bacteria; y es esperable que los determinantes genéticos de FV, si están localizados en la misma plataforma genética que los genes de resistencia antimicrobiana, pueden ser comovilizados bajo las condiciones de presión selectiva; estos aspectos de la asociación de la resistencia antimicrobiana y las características de virulencia en *E. coli* han sido ampliamente informado por Da Silva & Mendonça (2012). La aparición de resistencia a antimicrobianos en microorganismos patógenos compromete la efectividad del tratamiento clínico de las enfermedades infecciosas humanas y animales y tiene un impacto negativo en la salud pública mundial y en la eficiencia económica de la producción pecuaria (File y col., 2014; Friedman y col., 2016). En este sentido tanto el uso excesivo, como el mal uso de antibióticos ha llevado al desarrollo y selección de bacterias resistentes (Da Silva & Mendonça, 2012). Más allá del uso de medicamentos con fines terapéuticos en humanos y animales, los antibióticos también se usan ampliamente como agentes profilácticos y como promotores del crecimiento en animales de granja (Da Silva & Mendonça, 2012). La resistencia antimicrobiana desarrollada por aislados de *E. coli*, es uno de los principales motivos de las bajas tasas de curación de infecciones en el ganado bovino (Michael y col., 2017). Las estrategias de manejo que se aplican en el ganado lechero se han asociado con la alta tasa de aislamientos de *E. coli* resistentes a antibióticos de uso rutinario en el tambo (oxitetraciclina, clortetraciclina, sulfadimetoxina, ampicilina y neomicina) (Cummins y col., 2014).

Diversos estudios han reportado la resistencia antimicrobiana asociándola al perfil filogenético de cepas de *E. coli* patogénicas (Harwalkar y col., 2014; Michael y col., 2017); evaluaciones realizadas en animales han demostrado que las poblaciones de *E. coli* patogénicas productoras de β -lactamasas de espectro extendido (en inglés *Extended Spectrum β -Lactamases*: ESBL) son filogenéticamente particulares, siendo diferente aquellas de bovinos con respecto a cepas de origen porcino y aviar (Michael y col., 2017). Este tipo de clasificación filogenética de cepas patógenas de *E. coli* ha sido inicialmente propuesta por Clermont y col. (2000) y aplicadas en estudios de aislados de origen humano y animal (Johnson & Stell, 2000; Gordon y col., 2008). Los cuatro principales grupos filogenéticos descritos inicialmente son: A, B1, B2 y D (Herzer y col., 1990). En estudios posteriores que utilizaron la tipificación multilocus de secuencias (en inglés, *Multilocus Sequence Typing*: MLST) se sumaron los filogrupos C, E y F (Tenailon y col., 2010; Clermont y col., 2011).

Se ha reportado que *E. coli* de los diversos filogrupos pueden diferir en sus características fenotípicas y genotípicas, su nicho ecológico y su capacidad para causar enfermedad (Tenailon y col., 2010, Alm y col., 2011). Así, la mayoría de las cepas de *E. coli* comensales pertenecen a los filogrupos A y B1 y albergan pocos genes que codifican FV (Duriez y col., 2001) mientras que la distribución de *E. coli* diarreagénicas humanas incluye los filogrupos A, B1 y D; y existe alta probabilidad de que las cepas responsables de infecciones extra-intestinales humanas pertenezcan a los filogrupos B2 y D (Picard y col., 1999; Johnson & Stell, 2000). Entre las *E. coli* de origen animal existe una predominancia del filogrupo B1, seguido por A, B2, y en menor medida, por D (Escobar-Paramo y col., 2006; Baldy-Chudzick y col., 2008; Clermont y col., 2008; Tenailon y col., 2010). En bovinos, se ha descrito que aquellas cepas que causan mastitis por lo general pertenecen al grupo A o D (Dogan y col. 2006) mientras que las que se aíslan de útero se asociaron principalmente a B1 y A, y en menor medida a D (Silva y col., 2009; Sheldon y col., 2010). En este último trabajo los autores concluyeron que las cepas provenientes de animales con enfermedad uterina pertenecían predominantemente a B1 y A, mientras que los

provenientes del útero de animales sanos se distribuyeron más equitativamente entre los grupos A, B1 y D.

Si bien numerosos trabajos han intentado dilucidar el papel de *E. coli* en la patogénesis de la metritis y endometritis bovina, aún no se logró un consenso sobre el perfil de las cepas asociadas a dichos cuadros causantes de infertilidad (Silva y col., 2009; Bicalho y col., 2010; Sheldon y col., 2010; Kassé y col., 2016). Aislados de *E. coli* a partir de muestras de útero posparto bovino han sido parcialmente caracterizados por estos cuatro equipos de investigación basándose en reportes anteriores que informaron que *E. coli* es crucial para el establecimiento de la infección puerperal uterina (Sheldon y col., 2002; Miller y col., 2007; Williams y col., 2007). Así, *E. coli* ha sido reportada como la bacteria más frecuentemente aislada del útero durante la primera semana posterior a la parición y precede a la infección por otros patógenos como *Trueperella pyogenes*.

Como ya se ha mencionado previamente, Sheldon y col. (2010) describieron la posibilidad de que cepas de *E. coli* se hayan “pato-adaptado” para colonizar el endometrio y causar la enfermedad, designándolas como EnPEC. En concordancia, tanto Bicalho y col. (2010) como Kassé y col., (2016) indicaron que existe asociación entre cepas de *E. coli* aisladas de útero bovino y la ocurrencia de metritis posparto. Aunque todos estos autores demostraron que los genes que codifican ciertos FV, están asociados con enfermedades uterinas posparto, sus publicaciones difirieron en cuales son los perfiles de virulencia de mayor relevancia. Por lo tanto, la asociación entre los genes que codifican FV en *E. coli* y el establecimiento de metritis y/o endometritis puerperal bovina aún no está clara al igual que el rol que cumplen determinadas *E. coli* en el desarrollo del Síndrome de Vaca Repetidora (SVR); si bien se ha descrito que la colonización endometrial por *E. coli* puede alterar la función ovárica normal durante el puerperio (Magata y col., 2014), prolongando así el intervalo entre partos.

Por todo lo expuesto, se plantea la hipótesis de que aquellas vacas con trastornos reproductivos poseen en su microbiota vaginal poblaciones de *E. coli* con potencial patogenicidad sobre el endometrio.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1. Aislar y caracterizar *E. coli* nativas del TRB prevalentes en la región del NOA según:

-Patrones de resistencia a antimicrobianos y presencia de factores de virulencia asociados a *E. coli* enteropatógena.

-Perfiles de patogenicidad asociados a *E. coli* extra-intestinales.

2.2. Seleccionar *E. coli* nativas que exhiban los perfiles (de patogenicidad y resistencia) de mayor riesgo sanitario para el TRB.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. EVALUACIÓN CLÍNICA

La evaluación clínica se realizó como se describe en el ítem 3.2. del capítulo 1.

3.2. TOMA DE MUESTRAS

La toma de muestras se realizó como se describe en el ítem 3.3. del capítulo 1.

3.3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

El procesamiento de las muestras se realizó como se describe en el ítem 3.5.1. del capítulo 1.

3.4. ANIMALES

Las muestras utilizadas en esta etapa se obtuvieron de vaquillonas y vacas raza Holando Argentino pertenecientes a los grupos vaquillonas clínicamente sanas (**Vs**) y vacas con trastorno reproductivo (**Vtr**) descriptas en el ítem 3.1.1. del capítulo 1.

3.5. AISLAMIENTO DE *Escherichia coli*

3.5.1. CONDICIONES DE CULTIVO Y CONSERVACIÓN

Diluciones seriadas de las muestras de raspados vaginales se sembraron por agotamiento en superficie en Agar Mac Conkey (ver Anexo) y se incubaron a 37 °C en condiciones aeróbicas durante 48 y 48-72 hs, respectivamente. El número de microorganismos por volumen de muestra se expresó como log UFC mL⁻¹. De cada placa de Agar Mac Conkey se seleccionaron al azar hasta 4 colonias de color rosa (lactosa +), las cuales fueron inoculadas en 3 mL de caldo BHI (ver Anexo). Al cabo de 12-18 hs (37 °C) de incubación se realizó tinción de Gram, y se seleccionaron los bacilos cortos y Gram-negativos para ser conservados. Para ello se centrifugó 1 mL

de cada cultivo, los pellets se resuspendieron en caldo BHI adicionado con 20% de glicerol y se conservaron a -20 °C.

3.5.2. EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción del ADN genómico total se realizó a partir de cultivos *overnight* crecidos en BHI agar a 37 °C. Las células fueron lavadas con 200 µL de buffer de cloruro sódico-Tris-EDTA (STE) (150 mM NaCl, 50 mM Tris, 50 mM Na₂-EDTA). Seguidamente, se suspendieron en 200 µL de PBS y se les adicionó 10 µL de Proteinasa K (600 mUA mL⁻¹) y buffer de lisis (Buffer AL Qiagen, Alemania), después de una incubación (56 °C, 10 min) se adicionó 140 µL de NaCl 5M y cloroformo (25:1), para luego precipitar el ADN con isopropanol (Nadaroglu y col., 2015). Finalmente se lavó con alcohol 70°, se centrifugó y dejó secar para luego resuspender el ADN en agua libre de nucleasas.

3.6. IDENTIFICACIÓN DE *Escherichia coli*

3.6.1. PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Para identificar fenotípicamente las enterobacterias aisladas (conservadas a -20 °C), los cultivos conservados se activaron en caldo nutritivo (37 °C, 12 hs), luego se sembraron en agar Mac Conkey y se incubaron durante 24 hs a 37 °C; de cada placa se eligió al azar, una colonia lactosa + y se sembró en los diferentes medios para determinar el perfil bioquímico (**Tabla 1**). Previamente, se realizó tinción de Gram para confirmar la morfología característica de enterobacteria: bacilos cortos Gram negativos. La composición de los medios utilizados y su preparación se encuentran detalladas en el Anexo de este trabajo.

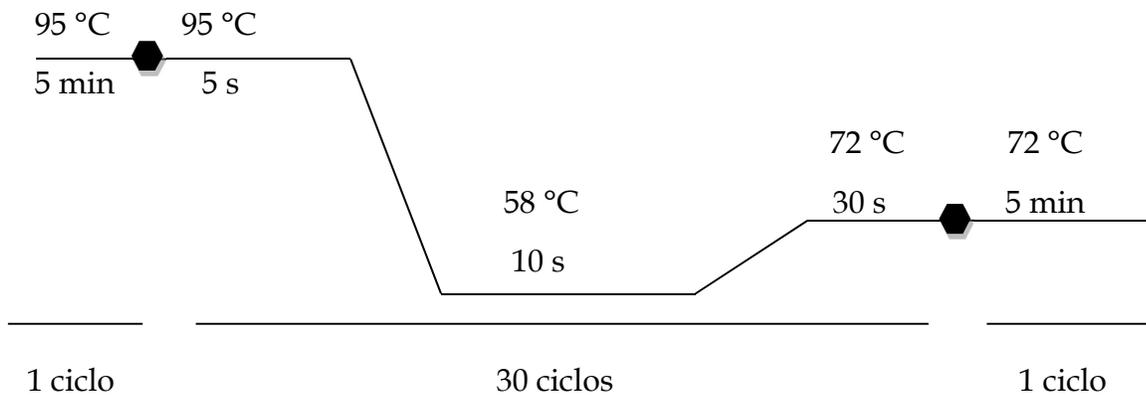
Tabla 1. Pruebas realizadas para la identificación bioquímica de las *E. coli* aisladas.

Prueba	Reacción
Morfología y coloración de Gram	Bacilos cortos, Gram-negativos
Citrato de Simmons	Negativo
Producción de indol (triptofanasa)	Positivo
Movilidad	Positiva o negativa
Hidrólisis de la urea	Negativa
Producción de ácido a partir de azúcares (TSI)	(amarillo) glucosa (+), lactosa (+)
Producción de gas	Positivo o negativo
Producción de H ₂ S	Negativo
Actividad fenilalanina desaminasa	Negativo
Actividad lisina descarboxilasa	Positivo
Fermentación ácido mixta (rojo de metilo)	Positivo
Fermentación butilenglicólica (Voges-Proskauer)	Negativo

3.6.2. DETECCIÓN DEL GEN DE β -D-glucuronidasa

La identificación de los aislados con perfiles bioquímicos compatibles con *E. coli* se confirmaron mediante la detección del gen de la β -D-glucuronidasa (*uidA*) por la técnica de PCR utilizando los cebadores específicos URL-301 y URR-432 (Bej y col., 1991; Wang y col., 2013). Dos cepas de referencia *E. coli* BEN312 y EDL933 fueron utilizadas como controles positivos y la misma mezcla de PCR sin templado fue utilizada como control negativo. Las secuencias de cebadores y temperatura de *annealing* se indican en la **Tabla 2**.

Las reacciones de amplificación por PCR se realizaron empleando la GoTaq Green Master Mix (2X) (Promega, EE.UU.) y el termociclador TECHNE TC-512 (Cole-Parmer, Reino Unido) según el siguiente protocolo: volumen de reacción= 25 μ L, templado= 1 μ L de ADN total, cebadores= 0,6 μ M de c/u, ciclos de amplificación:

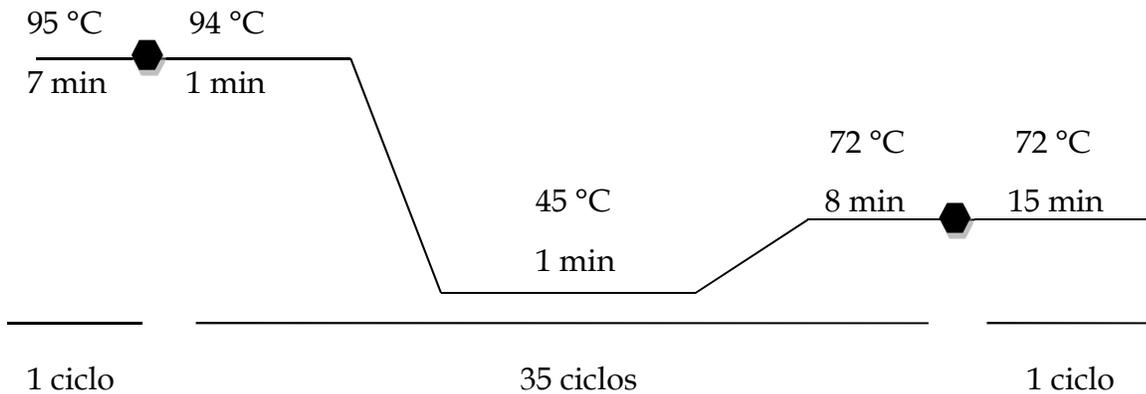


Posteriormente, se realizaron electroforesis en gel de agarosa (1% p/v) con GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, EE.UU.) a 100 V durante 20 min, utilizando un marcador de peso molecular de ADN de 50 pb (DNA GeneRuler, Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) para reconocer el tamaño del producto esperado. Los geles fueron revelados empleando un transiluminador UV y fotografiados.

3.7. EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE LOS AISLADOS DE *Escherichia coli*

Con el objetivo de determinar la relación clonal que existe entre los aislados de *E. coli*, se llevaron a cabo reacciones de *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC-PCR) según lo definido por Versalovic y col. (1991). Con esta técnica se amplificaron las regiones conservadas que separan las secuencias de ADN repetitivas (secuencias rep), las cuales se encuentran distribuidas en el cromosoma de muchas enterobacterias, obteniéndose amplicones de diferentes tamaños que se separaron mediante electroforesis mostrando patrones de distribución de bandas específicos para cada clon bacteriano (*fingerprint*). Para ello, se utilizó el cebador ERIC2 (5' AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG 3'). Las reacciones de amplificación por PCR se realizaron empleando la GoTaq (INBIO, RAPID, EE.UU.) y el termociclador TECHNE TC-512 (Cole-Parmer, Reino Unido) según el protocolo utilizado por Baltaci y col. (2015) con pequeñas modificaciones: volumen de reacción= 25 µL, Molde= 50 ngr de ADN total, 10 µM del cebador, 2,5 µM de cada

dNTP (Promega, EE.UU.), 10 x buffer de PCR, 1,5 mM de MgCl. Se incluyó un control negativo que consistía en la misma mezcla de PCR sin ADN. Ciclos de amplificación:



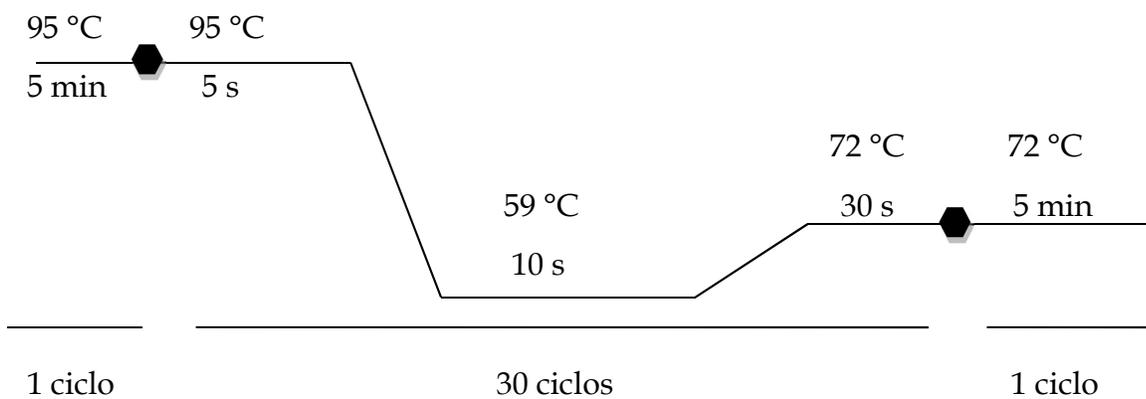
Posteriormente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (p/v) que contenía Diamond™ Nucleic Acid Dye (Promega, EE.UU.) a 70 V durante 6 hs, utilizando un marcador de peso molecular de ADN de 50 pb (DNA GeneRuler, Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) para reconocer el tamaño del producto esperado. Los gels fueron revelados empleando un transiluminador UV y fotografiados.

Los *fingerprints* de ADN fueron analizados utilizando el Software Bionumerics versión 7.6 de Applied Maths (Sint-Martens-Latem, Bélgica). El grado de similitud entre dichas huellas genéticas fue calculado mediante el Coeficiente de correlación de Pearson y el agrupamiento (*clustering*) se basó en el método del coeficiente no ponderado de grupo de pares utilizando promedios aritméticos (UPGMA).

3.8. PERFIL FILOGENÉTICO

Los aislados previamente identificados como *E. coli* se clasificaron en cuatro grupos filogenéticos siguiendo los criterios propuestos por Clermont y col. (2000) basado en la presencia de tres marcadores genéticos: *chuA*, *yjaA* y TspE4.C2. Para ello, se empleó un protocolo de multiplex PCR utilizando los tres pares de cebadores

(**Tabla 2**) a una concentración de 0,08 μM para cada uno. Se incluyeron controles de calidad que consistieron en la misma mezcla de PCR sin ADN así como cepas positivas a cada marcador. Las amplificaciones se realizaron empleando 12,5 μL de GoTaq Green Master Mix (2X) (Promega, EE.UU.) y el termociclador TECHNE TC-512 (Cole-Parmer, Reino Unido) según el siguiente protocolo: Volumen de reacción= 25 μL , Molde= 1 μL de ADN total, 6 cebadores= 20 pmol c/u. Ciclos de amplificación:



Posteriormente, se realizaron electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v) que contenían GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, EE.UU.) a 100 V durante 45 min, utilizando un marcador de peso molecular de ADN de 50 pb (DNA GeneRuler, Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) para reconocer el tamaño del producto esperado. Los geles fueron revelados empleando un transiluminador UV y fotografiados.

Tabla 2. Cebadores utilizados en los protocolos de PCR para la identificación, caracterización filogenética de *E. coli* y determinación de sus FV

Gen	Secuencia de cebadores (5'-3')	T° de annealing	Tamaño	Referencia
<i>uid A</i>	TGTTACGTCCTGTAGAAAGCCC AAAACCTGCCTGGCACAGCAATT	58 °C	154 bp	Bej y col., 1991
<i>chuA</i>	GACGAACCA ACGGTCAGGAT TGCCGCCAGTACC AAAGACA	58 °C	279 bp	Clermont y col., 2000
<i>yjaA</i>	TGAAGTGTACAGGAGACGCTG ATGGAGAAATGCGTTCCTCAAC	58 °C	211 bp	Clermont y col., 2000
TspE4C2*	GAGTAATGTCGGGGCATTCA CGCGCCAACAAAGTATTACG	58 °C	152 bp	Clermont y col., 2000
<i>fimH</i>	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG GCAGTACCTGCCCTCCGGTA	63 °C	508	Johnson & Stell, 2000
<i>sfa/focDE</i>	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	63 °C	410	Johnson & Stell, 2000
<i>papC</i>	GTGGCAGTATGAGTAATGACCGTTA ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	63 °C	200	Johnson & Stell, 2000
<i>afa/draBC</i>	GGCAGAGGGCCGGCAACAGGC CCCGTAACGCGCCAGCATCTC	63 °C	559	Johnson & Stell, 2000
<i>hlyA</i>	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA	63 °C	1177	Johnson & Stell, 2000
<i>fyuA</i>	TGATTAACCCCGCGACGGGAA CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	63 °C	880	Johnson & Stell, 2000
<i>iutA</i>	GGCTGGACATCATGGGAACTGG CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	63 °C	300	Johnson & Stell, 2000
<i>kpsMT II</i>	GCGCATTGCTGATACTGTTG CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	63 °C	272	Johnson & Stell, 2000
<i>traT</i>	GGTGTGGTGCGATGAGCACAG CACGGTTCAGCCATCCCTGAG	63 °C	290	Johnson & Stell, 2000
<i>agn43</i>	CTGGAAACCGGTCTGCCCTT CCTGAACGCCAGGGTGATA	58 °C	433	Klemm y col., 2004
<i>csgA</i>	ACTCTGACTTGACTATTACC AGATGCAGTCTGGTCAAC	55 °C	200	Maurer y col., 1998
<i>eae</i>	GGAACGGCAGAGGTTAATCTGCAG GGCGTTCATCATAGTCTTTC	55 °C	775	Blanco y col., 2004
Gen que codifica F41	GCATCAGCGGCAGTATCT GTCCCTAGCTCAGTATTATCACCT	50 °C	380	Frank y col., 1998
Gen que codifica F5 (K99)	TATTATCTTAGGTGGTATGG GGTATCCTTTAGCAGCAGTATTTC	50 °C	314	Frank y col., 1998
Gen que codifica STa	GCTAATGTTGGCAATTTTTATTCTGTGA AGGATTACAACAAAGTTCACAGCAGTAA	50 °C	190	Frank y col., 1998

CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL DE PATOGENICIDAD DE AISLADOS DE *Escherichia coli* VAGINALES BOVINAS

Se estudiaron los FV de *E. coli* vaginales aisladas como se describió previamente en la **sección 3.8**. Se tuvieron en cuenta aquellos factores asociados a cepas de *E. coli* patógenas intestinales y extraintestinales (Bicalho y col. 2010; Sheldon y col. 2010, Silva y col. 2009).

3.9. ETAPA 1: EVALUCIÓN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y PRESENCIA DE FACTORES DE VIRULENCIA ASOCIADOS A *Escherichia coli* ENTEROPATÓGENA

3.9.1. MICROORGANISMOS EVALUADOS

Para el presente ensayo se eligieron al azar 60 aislados del total *E. coli* obtenidas de los muestreos de animales descritos en el ítem 3.4.

3.9.2. MICROORGANISMOS DE REFERENCIA

Escherichia coli EDL933 (STEC *eae*) y B41 (ETEC *F5; F41; STa*) son cepas ATCC de referencia y fueron utilizadas en este ensayo como controles de calidad (Franck y col., 1998).

3.9.3. SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS

El perfil de resistencia a antimicrobianos de los 60 aislados de *E. coli* se determinó por el método de difusión en disco de acuerdo con las recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). La sensibilidad a antimicrobianos se ensayó en placas de agar Mueller Hinton (MH). Los discos de antibióticos con sus respectivas cargas, utilizados en estos ensayos fueron: amoxicilina/ácido clavulánico (30 µg), ampicilina (10 µg), ceftazidima (30 µg),

ceftiofur (30 µg), estreptomina (25 µg), tetraciclina (30 µg), enrofloxacina (5 µg) y sulfametoxazol/trimetoprima (25 µg).

Los microorganismos fueron previamente activados en agar sangre (18 hs, 37 °C). A partir de estas placas, se realizaron suspensiones bacterianas en solución fisiológica (SF) ajustando la turbidez a la equivalente del 0,5 de la escala de Mc Farland ($1,2 \times 10^8$ UFC mL⁻¹), las cuales fueron sembradas con hisopo estéril en placas de MH agar. Luego de dejarlas reposar unos minutos se colocaron los discos de antibióticos con pinza estéril con un máximo de 6 discos por placa que posteriormente se incubaron a 37 °C en aerobiosis durante 18hs. Cumplido el tiempo de incubación, se observaron los halos de inhibición y se midieron sus diámetros (expresados en mm) como indica la **Figura 1**. Los mismos se compararon con los puntos de corte incluidos en la tabla para enterobacterias propuestos por el CLSI-M100-S22 (2012) y se los clasificó como sensible, intermedio o resistente al antibiótico en estudio.

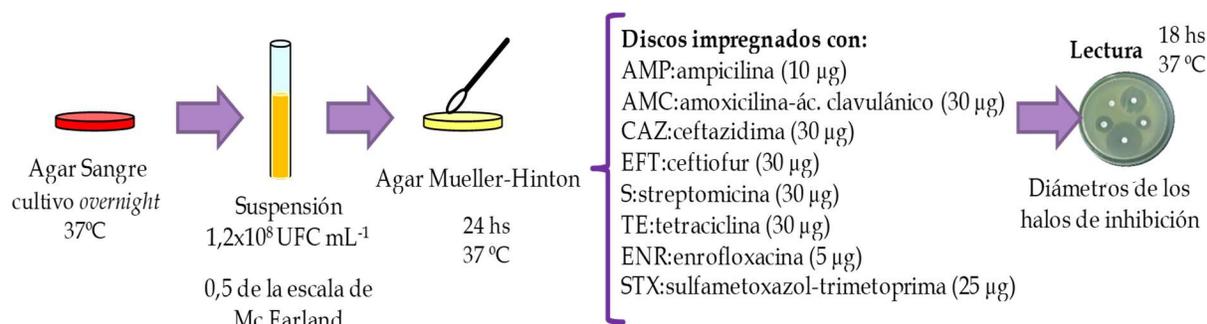


Figura 1. Método de difusión en disco de acuerdo con las recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012).

3.9.4. PRESENCIA DE GENES ASOCIADOS A FACTORES DE VIRULENCIA DE *Escherichia coli* ENTEROPATÓGENICAS

La presencia de genes de virulencia asociados a cepas de *E. coli* patógenas intestinales se evaluó mediante reacciones de PCR. Las secuencias de cebadores y las temperaturas de *annealing* se indican en la **Tabla 2**.

La detección del gen *eae* (Intimina), asociado tanto a cepas *E. coli* enteropatógena (EPEC) como a productoras de toxina *shiga-like* (STEC) se realizó mediante PCR estándar previamente descrita por Blanco y col. (2004). También se determinó la presencia de dos genes fimbriales: F41 y F5 (K99) así como el gen que codifica para la enterotoxina termoestable (STa), siendo todos estos marcadores de virulencia asociados con *E. coli* enterotoxigénica (ETEC). Para la evaluación de dichos genes, se llevó a cabo un protocolo de multiplex PCR en 25 µL de volumen de reacción en condiciones similares a las indicadas anteriormente en el ítem. 3.8. Sin embargo, en este caso, se añadieron 0,2 µL de cada una de las seis soluciones de cebadores según lo descrito por Frank y col. (1998) (**Tabla 2**).

Para ambos ensayos, *E. coli* EDL933 y B41 se utilizaron como controles de calidad (Frank y col., 1998) además del control negativo (mezcla de PCR sin ADN). Los amplicones obtenidos en ambos ensayos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1 y 1,5% (p/v), respectivamente.

3.10. ETAPA 2: EVALUACIÓN DE GENES ASOCIADOS A FACTORES DE VIRULENCIA DE *Escherichia coli* EXTRA-INTESTINALES.

3.10.1. MICROORGANISMOS EVALUADOS

Para el presente ensayo se utilizaron los 97 aislados de *E. coli* obtenidos de los muestreos de animales previamente descritos.

3.10.2. MICROORGANISMOS DE REFERENCIA

Las cepas de *E. coli* detalladas a continuación se utilizaron como controles positivos: BEN2908 (APEC *fimH*; *iutA*; *ibeA*), BEN312 (ExPEC *afa*; *papC*), EDL933 (STEC *agn43*), 536 (UPEC *sfaS*; *fyuA*) y HdN3 (UPEC *hlyA*; *cnf1*; *traT*; *kpsMT II*).

Las cepas control BEN2908, 536 y BEN312 fueron obtenidas de la colección del Institut National de la Resherche Agronomique (INRA, Francia) gracias a la colaboración de la Dra. Catherine Schouler. La cepa HdN3 fue cedida por La Dra. Noemí Sarsano el laboratorio de bacteriología del Hospital del Niño Jesús (San Miguel de Tucumán, Argentina).

3.10.3. PRESENCIA DE GENES ASOCIADOS A FACTORES DE VIRULENCIA DE *Escherichia coli* EXTRA-INTESTINALES

Para la evaluación de la presencia de genes de virulencia asociados con ExPEC: *fimH*, *papC*, *sfa/focDE*, *csgA*, *afa/draBC*, *fyuA*, *iutA*, *hlyA*, *traT*, *kpsMT II* y *agn43* (**Tabla 3**) se realizaron ensayos de PCR convencionales (Silva y col., 2009; Bicalho y col., 2010; Sheldon y col., 2010). Todas las reacciones se realizaron en un volumen de 25 µL utilizando los cebadores detallados en la **Tabla 2**.

Tabla 3. Genes de virulencia estudiados en los aislados de *E. coli*

Genes de virulencia	Descripción	Referencia
Adhesinas		
<i>papC</i>	pili asociado a pielonefritis	Johnson & Stell, 2000
<i>sfa/focDE</i>	fimbrias S y F1C	Johnson & Stell, 2000
<i>afa/draBC</i>	adhesinas Dr-binding afimbriales	Johnson & Stell, 2000
<i>fimH</i>	fimbria tipo 1	Johnson & Stell, 2000
Formación de biofilm		
<i>agn43</i>	antígeno 43	Klemm y col., 2004
<i>csgA</i>	fimbria curly	Maurer y col., 1998
Toxinas		
<i>hlyA</i>	α -hemolisina	Johnson & Stell, 2000
Sideróforos		
<i>fyuA</i>	receptor yersiniabactina	Johnson & Stell, 2000
<i>iutA</i>	receptor aerobactina	Johnson & Stell, 2000
Protectinas		
<i>kpsMT II</i>	síntesis de cápsula del grupo 2	Johnson & Stell, 2000
<i>traT</i>	resistencia sérica	Johnson & Stell, 2000

3.11. ETAPA 3: EXPRESIÓN DE PROPIEDADES ASOCIADAS A PATOGENICIDAD EN *Escherichia coli*

3.11.1. α -HEMÓLISIS

La producción de α -hemólisis se determinó mediante el análisis de la zona de hemólisis observada a partir de un cultivo *overnight* a 37 °C en agar sangre (sangre de carnero al 5%) según la técnica descrita por Sakoulas y col. (2002).

3.11.2. FACTORES ASOCIADOS A ADHESIÓN Y COLONIZACIÓN

a- MOVILIDAD

La movilidad se evaluó en agar Luria Bertani (LB) al 0,3% a través de la medición del diámetro de migración. Para ello los cultivos conservados en -20 °C se sembraron en placas de LB agar al 1% y se incubaron durante 12 h a 37 °C. De estos cultivos se seleccionó, al azar, una colonia de cada placa y se sembró en un punto de la placa de agar LB 0,3%. Las mismas se incubaron a 37 °C durante 8 hs, y la movilidad se evaluó midiendo el diámetro de la migración de las bacterias a través del agar, desde el centro hacia la periferia a partir del punto de inoculación (**Figura 2**).

La movilidad de cada aislado se valoró como la media del diámetro obtenido en tres experimentos independientes. En base a la distribución de los diámetros obtenidos se definió una escala para categorizar los datos: (I) inmóvil, (Mb) movilidad baja, (Mm) movilidad media y (Ma) movilidad alta.

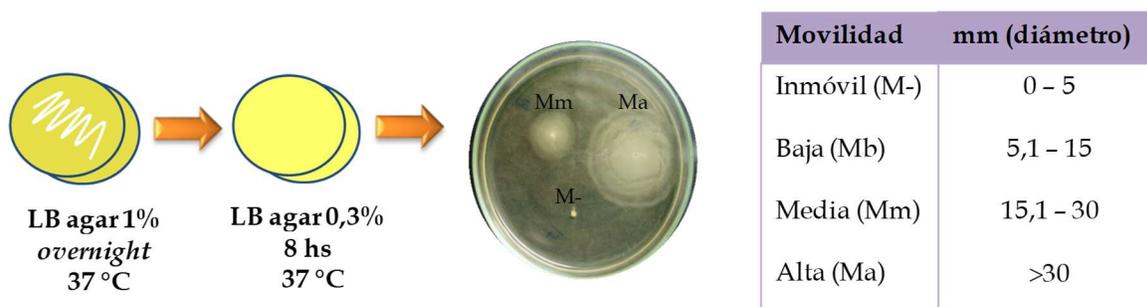


Figura 2. Determinación de la movilidad según el diámetro de migración del crecimiento bacteriano en placas de agar LB 0,3%.

b- EXPRESIÓN DE FIMBRIA CURLY Y/O CELULOSA

La capacidad de los aislados de *E. coli* vaginales de producir fimbria curly y/o celulosa fue estudiada a partir de suspensiones bacterianas ($DO_{540\text{ nm}}=1,0$ en PBS) obtenidas de un cultivo *overnight* en agar LB sin NaCl a 37 °C según lo previamente descrito por Ma & Wood (2009), con pequeñas modificaciones. Así, 30

µL de cada suspensión bacteriana a 2 mL de caldo LB (sin NaCl) para luego ser incubados durante 3 hs a 37 °C en agitación. Seguidamente, 5 µL de cada cultivo fueron sembrados en un punto sobre placas de agar LB (sin NaCl) suplementado con Rojo Congo (RC) (40 µg mL⁻¹) y azul de bromofenol (20 µg mL⁻¹). Luego de una incubación de 48 hs a 30 °C, se evaluó la expresión de fimbria curly y/o celulosa por el color y morfología de las colonias obtenidas.

Los aislados se clasificaron en primera instancia de acuerdo con los morfotipos descriptos previamente (Römling y col., 1998; Bokranz y col., 2005): rdar (colonia roja, seca y rugosa), pdar (colonia rosa, seca y rugosa), bdar (colonia marrón, seca y rugosa), bas (colonia marrón y lisa) y saw (colonia lisa y blanca), según se observan en la **Figura 3**.

Si bien el Rojo Congo se une específicamente a fimbrias amiloides, como la fimbria curly, está reportado que puede unirse de manera inespecífica a otros polímeros presentes en la matriz de los biofilms, como es el caso de la celulosa (Van Gerven y col., 2015). Es por ello que se decidió hacer una interpretación diferente: clasificando los fenotipos observados como Rojo Congo positivo (RC+) a aquellos aislados que expresaron fimbria curly y/o celulosa (morfotipos rdar, pdar, bdar y bas) y como Rojo Congo negativo (RC-) a aquellos aislados que no expresaron ni fimbria curly, ni celulosa (morfotipo saw).

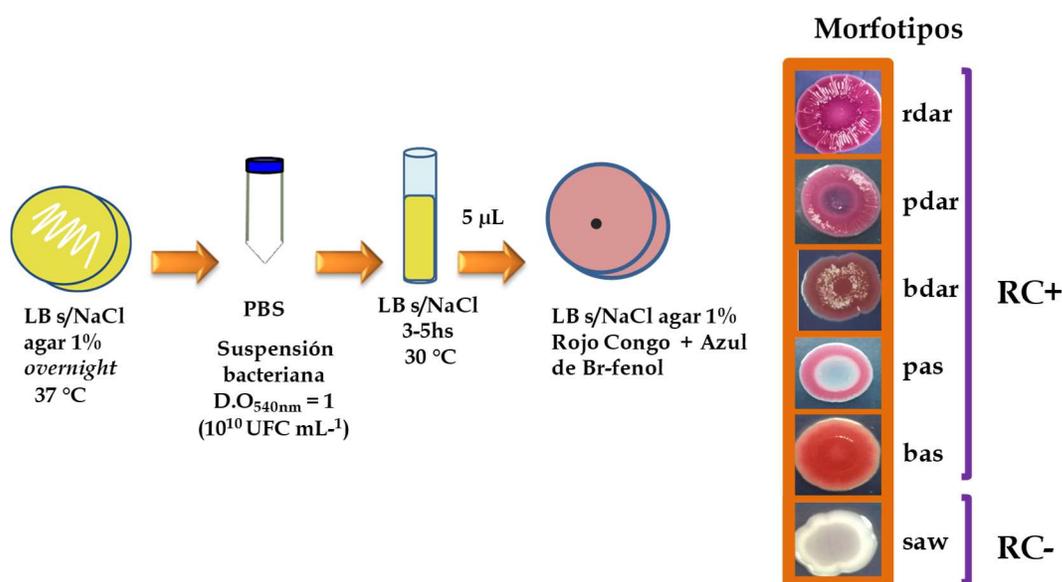


Figura 3. Determinación fenotípica de la expresión de fimbria curly y/o celulosa.

c- FORMACIÓN DE BIOFILM

La capacidad de formar biofilm sobre superficies abióticas (vidrio y poliestireno) se determinó según metodología descrita previamente con algunas modificaciones (Römling y col., 1998; Hussain y col., 2012). Así, se prepararon suspensiones de *E. coli* ($DO_{540nm}=1,0$ en PBS) a partir de cultivos *overnight* (en LB agar sin NaCl, 37 °C). Para evaluar la formación de biofilm en tubos de vidrio, se inocularon 30 μ L de cada suspensión bacteriana en 3 mL de LB sin NaCl (dilución 1:100) y se incubaron durante 48 hs a 30 °C sin agitación. Previo a dicha incubación, se tomaron cuatro alícuotas de 200 μ L de cada suspensión y se sembraron en microplaca de poliestireno de 96 pocillos. Las microplacas fueron luego cubiertas con parafilm e incubadas bajo las mismas condiciones experimentales que los tubos de vidrio. Luego de 48 hs, el medio fue aspirado suavemente tanto de los tubos de vidrio (previa inspección visual) como de los pocillos, y ambas superficies abióticas se lavaron dos veces con PBS para luego ser secadas al aire (6 hs). A continuación, los biofilms fueron teñidos con solución de cristal violeta (0,1% p/v) durante 30 min, se lavaron con agua destilada y se secaron al aire. Luego, se añadió etanol 96° a cada pocillo y tubo de vidrio seguido de una incubación de 15 min. Para la cuantificación del biofilm se midió la densidad óptica (DO) del colorante re-solubilizado a DO_{590nm} . Se utilizó un lector de microplacas para la lectura de las eluciones de las microplacas de poliestireno y un espectrofotómetro para la de las eluciones de los tubos de vidrio. En cada ensayo se incluyeron pocillos o tubos (según correspondiese) con medio LB sin NaCl y sin inocular como control negativo, el mismo fue usado como blanco en el momento de la lectura de la DO (**Figura 4**). Se utilizó como control positivo uno de los aislados con mayor producción de biofilm.

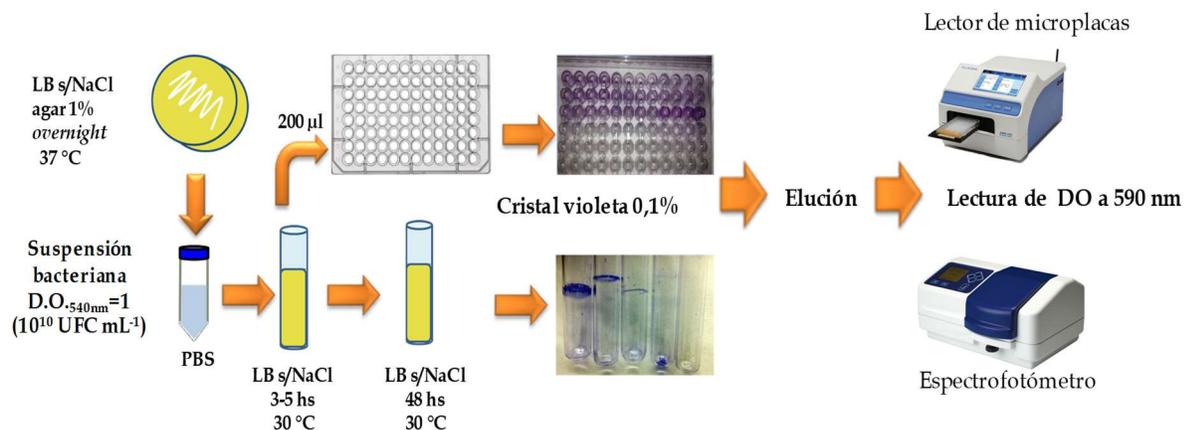


Figura 4. Determinación fenotípica de formación de biofilm sobre superficies abióticas (vidrio y poliestireno).

d- PRESENCIA DE FIMBRIA P Y PILI TIPO I

Para determinar la expresión de las fimbrias tipo 1 y P se evaluó la aglutinación de células de *Sacharomyces cerevisiae* y la hemoaglutinación de glóbulos rojos humanos grupo A, respectivamente. Para ambos ensayos, se prepararon suspensiones bacterianas con 10¹² UFC mL⁻¹ (OD_{540nm}=1,2, en PBS) a partir de cultivos *overnight* en LB caldo de una única colonia de cada aislado (**Figura 5**).

Para la evaluación de la capacidad de las bacterias de expresar las fimbrias de tipo 1, se aplicó la técnica descrita por Schembri y col. (2000) con algunas modificaciones menores: las levaduras fueron lavadas y suspendidas en PBS (OD_{540nm}=1,2), luego se mezclaron 50 µL de las dos suspensiones celulares (bacterias y levaduras) en un portaobjetos de vidrio con leve agitación durante 5 min. La visualización de agregados se consideró positiva.

La presencia de la fimbria P se comprobó según la técnica previamente descrita por Jadhav y col. (2011) con algunas pequeñas modificaciones: Brevemente, los glóbulos rojos (GR) humanos de grupo A fueron lavados dos veces con PBS y luego diluidos al 5% con el mismo medio. A continuación, 50 µL de la suspensión de GR fueron mezclados en un portaobjetos de vidrio con el mismo volumen de las suspensiones bacterianas (DO₅₄₀=1,2). Después de 5 min de agitación, se evaluó la formación de agregados celulares.

Todos los aislados positivos en estos ensayos se evaluaron nuevamente pre incubando la suspensión bacteriana con 1% α -metil-D-manopiranososa durante 30 min a 25 °C.

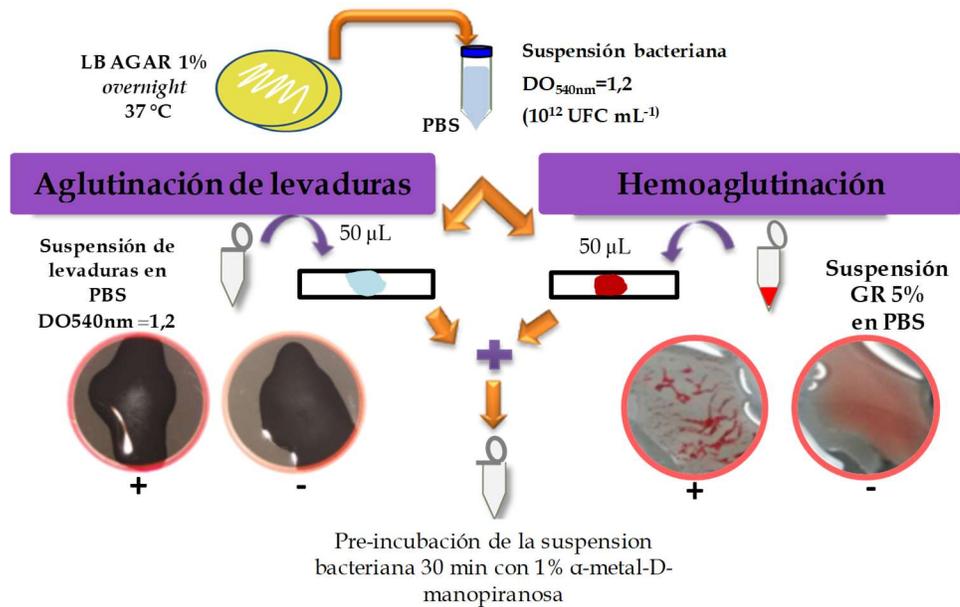


Figura 5. Determinación fenotípica de la expresión de las fimbrias tipo 1 y P.

3.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los ensayos se realizaron, por duplicado o triplicado y fueron evaluados estadísticamente mediante el análisis de la varianza y un post test (Prueba de t de *student*, con $\alpha=0,05$) para comparaciones múltiples, en aquellos casos en que los efectos o sus interacciones fueron significativos. Los resultados expresados con valores categóricos fueron evaluados mediante una tabla de contingencia, para expresar la relación entre el score sanitario de las muestras vaginales y la expresión de los FV de los aislados correspondientes (se calculó la contribución a Chi-cuadrado). Además, se realizó un análisis multivariado de correspondencia para evaluar la asociación entre la caracterización tanto fenotípica como genotípica de las *E. coli* vaginales estudiadas y los grupos de animales muestreados.

Se empleó el test de ANOVA (modelo lineal general) para el análisis de residuos y determinación de efectos. En los casos en que los residuos no

evidenciaron una distribución normal, se aplicó un análisis no paramétrico de la varianza (Prueba de Kruskal Wallis).

El procesamiento de datos se llevó a cabo utilizando tres *softwares*: MINITAB (versión 15), InfoStat (versión 2015p) y JMP (versión Pro 13).

4. RESULTADOS

4.1. ANIMALES CON CULTIVOS POSITIVOS PARA *Escherichia coli*

El 60,1% de las vaquillonas incluidas en el ensayo (n=48 vaquillonas aptas para la reproducción, **Vs**) resultó positivo para el aislamiento de *E. coli*, mientras que la totalidad (100%, n=49) de las vacas adultas (**Vtr**) fueron positivas para el aislamiento de dicho microorganismo. En este último grupo se incluyeron 13 vacas con enfermedad uterina de hasta 60 días posparto (**Vmt**) y 36 vacas con síndrome de vaca repetidoras de celo (**Vr**).

4.2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Escherichia coli* NATIVAS DEL TRB

A partir de los cultivos en placas de agar Mac Conkey se obtuvieron 141 aislados lactosa (+). La procedencia e identificación fenotípica parcial de los aislados obtenidos de vaquillonas y de vacas con trastornos reproductivos se incluyeron en las **Tablas 4** y **5**, respectivamente. La identificación fenotípica se realizó mediante pruebas bioquímicas: utilización del citrato de sodio, producción de indol, movilidad, hidrólisis de urea, TSI (capacidad de fermentar carbohidratos, de producir H₂S y producir gas), fenil-alanina-desaminasa, lisina-descarboxilasa, rojo de metilo y Voges-Proskauer. De 141 aislados lactosa (+) obtenidos en agar Mc Conkey, 100 presentaron perfil bioquímico compatible con *E. coli*.

Seguidamente, a partir de estos 100 aislados la identificación fue confirmada como *E. coli* en 97 de ellos mediante la detección del gen de la β -D-glucuronidasa (*uidA*) por la técnica de PCR.

Tabla 4. Pruebas bioquímicas para la identificación de *E. coli* y confirmación por PCR a partir de enterobacterias aisladas del TRB de vaquillonas sanas (Vs).

Aislado	Animal	Agar Mac Conkey	Citrato	TSI	VP	RM	SIM	Urea	Fenil - Alanina	LIA	Confirmación por PCR
1001	2	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), H2S (-)	-	+	I (+), M (-)	-	-	+	+
1002	2	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H2S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1003	4	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H2S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1004	8	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), H2S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1005	8	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H2S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1006	8	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H2S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1007	1	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), H2S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1008	1	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H2S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1009	1	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H2S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1010	9	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), H2S (-)	-	+	I (+), M (-)	-	-	+	+
1011	14	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H2S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1012	2	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), H2S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1013	2	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H2S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1014	2	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), H2S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1015	2	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H2S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1016	4	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H2S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+

Aislado	Animal	Agar Mac Conkey	Citrato	TSI	VP	RM	SIM	Urea	Fenil - Alanina	LIA	Confirmación por PCR
1017	4	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1018	4	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1019	4	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1020	4	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1021	8	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (-), M (-)	-	-	+	-
1022	8	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1023	8	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1024	8	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1025	8	Lac (+)	+	Glu (+), Lac (+), H ₂ S (-)	-	+	I (-), M (+)	-	-	+	-
1026	11	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1027	11	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), H ₂ S (-)	-	-	I (+), M (+)	-	-	+	+
1028	6	Lac (+)	+	Glu (+), Lac (+), H ₂ S (-)	-	-	I (-), M (+)	-	-	+	-
1029	6	Lac (+)	+	Glu (+), Lac (+), H ₂ S (-)	-	-	I (-), M (+)	-	-	+	-
1030	6	Lac (+)	+	Glu (+), Lac (+), H ₂ S (-)	-	-	I (-), M (+)	-	-	+	-
1031	6	Lac (+)	+	Glu (+), Lac (+), H ₂ S (-)	-	-	I (-), M (+)	-	-	+	-
1032	7	Lac (+)	+	Glu (+), Lac (+), H ₂ S (-)	-	-	I (-), M (+)	-	-	+	-
1033	7	Lac (+)	+	Glu (+), Lac (+), H ₂ S (-)	-	-	I (-), M (+)	-	-	+	-

Aislado	Animal	Agar Mac Conkey	Citrato	TSI	VP	RM	SIM	Urea	Fenil - Alanina	LIA	Confirmación por PCR
1034	10	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1035	10	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1036	10	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1037	10	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (-)	-	-	+	+
1038	10	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (-)	-	-	+	+
1039	10	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1040	12	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (-)	-	-	+	+
1041	12	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (-)	-	-	+	+
1042	12	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1043	12	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1044	12	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1045	13	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1046	13	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1047	13	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1056	13	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (-)	-	-	+	+
1048	13	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1049	13	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1050	13	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+

Aislado	Animal	Agar Mac Conkey	Citrato	TSI	VP	RM	SIM	Urea	Fenil - Alanina	LIA	Confirmación por PCR
1051	12	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1052	7	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1053	7	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1054	2	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1055	2	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1510	2005	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), H ₂ S (-)	-	+	I (-), M (+)	-	-	+	-

Tabla 5. Pruebas bioquímicas para la identificación de *E. coli* y confirmación por PCR a partir de enterobacterias aisladas del TRB de vacas con trastornos reproductivos (VTR).

Aislado	Animal	Examen Clínico	Agar Mac Conkey	Citrato	TSI	VP	RM	SIM	Urea	Fenil - Alanina	LIA	Confirmación por PCR
2001	5236	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (-)	-	-	+	+
2002	5236	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
2003	5236	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
2004	5960	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (-), M (-)	-	-	+	-
2005	7041	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (-), M (+)	-	-	+	-
2006	7041	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (-), M (+)	-	-	+	-
2007	7041	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (-)	-	-	+	+
2008	484	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
2009	484	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (-)	-	-	+	+
2010	484	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (-)	-	-	+	+
2011	484	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (-), M (-)	-	-	+	-
2012	312	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (-), M (-)	-	-	+	-
2013	312	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
2014	312	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
2015	312	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (-), M (-)	-	-	+	-

Aislado	Animal	Examen Clínico	Agar Mac Conkey	Citrato	TSI	VP	RM	SIM	Urea	Fenil - Alanina	LIA	Confirmación por PCR
2016	7086	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
2017	7086	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (-), M (+)	-	-	+	-
2018	7086	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
2019	272	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (-)	-	-	+	+
2020	272	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (-)	-	-	+	+
2021	272	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (-)	-	-	+	+
2022	6146	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (-), M (-)	-	-	+	-
2023	2	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
2024	2	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
2025	4	Vr	Lac (+)	+	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (-)	-	-	+	-
2026	4	Vr	Lac (+)	+	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (-)	-	-	+	-
2027	4	Vr	Lac (+)	+	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (-)	-	-	+	-
2028	4	Vr	Lac (+)	+	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (-)	-	-	+	-
2029	4	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (-), M (-)	-	-	+	-
2030	4	Vr	Lac (+)	+	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (-)	-	-	+	-
2031	4	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (-)	-	-	+	-
2032	4	Vr	Lac (+)	+	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (-)	-	-	+	-
2033	4	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	-

Aislado	Animal	Examen Clínico	Agar Mac Conkey	Citrato	TSI	VP	RM	SIM	Urea	Fenil - Alanina	LIA	Confirmación por PCR
2034	4	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (-), M (+)	-	-	+	-
2035	4	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (-), M (+)	-	-	+	-
2036	8	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
2037	8	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
2038	8	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
2039	8	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
2040	8	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (-)	-	-	+	+
2041	1	Vr	Lac (+)	+	Glu (+), Lac (+), H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	-
2042	A155	Vr	Lac (+)	+	Glu (+), Lac (+), H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	-
2043	A155	Vr	Lac (+)	+	Glu (+), Lac (+), H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	-
2044	A155	Vr	Lac (+)	+	Glu (+), Lac (+), H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	-
2048	3203	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (-)	-	-	+	+
2049	3203	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
2050	3203	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (-)	-	-	+	+
2051	3203	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
2052	3204	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (-)	-	-	+	+
2053	3204	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
2054	3204	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (-)	-	-	+	+

Aislado	Animal	Examen Clínico	Agar Mac Conkey	Citrato	TSI	VP	RM	SIM	Urea	Fenil - Alanina	LIA	Confirmación por PCR
2055	3204	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
2056	3206	Vr	Lac (+)	+	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (-)	-	-	+	-
2058	3206	Vr	Lac (+)	+	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (-)	-	-	+	-
2059	3206	Vr	Lac (+)	+	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (-)	-	-	+	-
3001	6099	Vmt	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
3002	6686	Vmt	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
3003	7041	Vmt	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (-), M (+)	-	-	+	-
3004	6689	Vmt	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (-), M (+)	-	-	+	-
3006	VISC 1	Vmt	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
3007	VISC2	Vmt	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
3008	3202	Vmt	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (-)	-	-	+	+
3009	3202	Vmt	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
3010	3202	Vmt	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
3011	3202	Vmt	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
3012	3208	Vmt	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
3013	3208	Vmt	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
3014	3211	Vmt	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1500	2001	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (-)	-	-	+	-

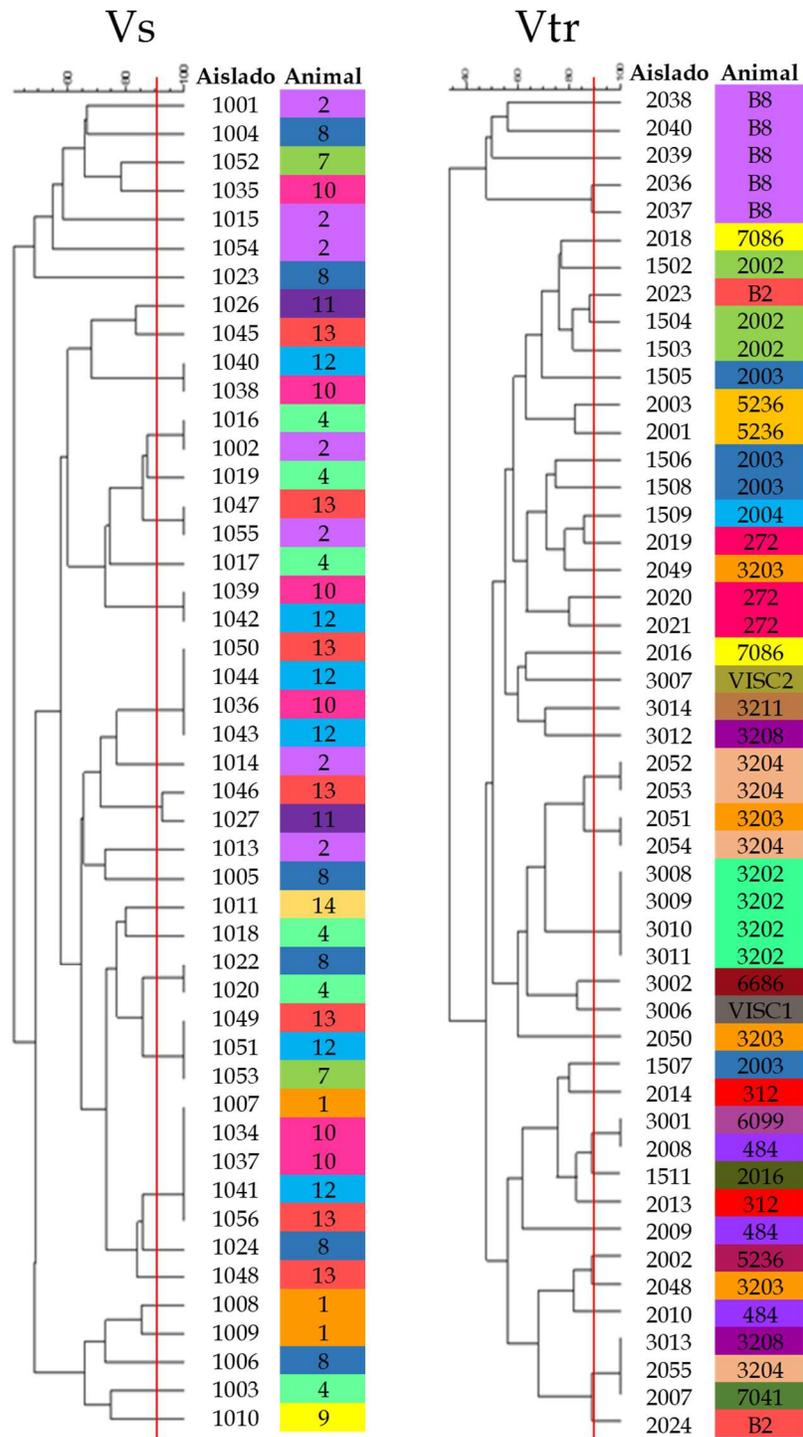
Aislado	Animal	Examen Clínico	Agar Mac Conkey	Citrato	TSI	VP	RM	SIM	Urea	Fenil - Alanina	LIA	Confirmación por PCR
1501	2001	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (-)	-	-	+	-
1502	2002	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1503	2002	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1504	2002	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1505	2003	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1506	2003	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1507	2003	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1508	2003	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1509	2004	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (+)	-	-	+	+
1511	2016	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (-)	-	-	+	+
1512	2016	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), H ₂ S (-)	-	+	I (-), M (-)	-	-	+	-
1513	2016	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), Gas, H ₂ S (-)	-	+	I (-), M (-)	-	-	+	-
1514	2016	Vr	Lac (+)	+	Glu (+), Lac (+), H ₂ S (-)	-	+	I (+), M (-)	-	-	+	-
1515	2022	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), H ₂ S (-)	-	+	I (-), M (-)	-	-	+	-
1516	2022	Vr	Lac (+)	-	Glu (+), Lac (+), H ₂ S (-)	-	+	I (-), M (-)	-	-	+	-

4.3. EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE LOS AISLADOS DE *Escherichia coli*

Para evaluar la diversidad genética entre los aislados de *E. coli*, se utilizó la técnica de ERIC-PCR y se evaluó el agrupamiento de los *fingerprints* de *E. coli* en dendogramas basados en UPGMA. Los perfiles fueron analizados de acuerdo con la condición clínico-reproductiva de las hembras muestreadas en 2 grupos diferentes (**Vs** y **Vtr**) como indica la **Figura 7**. La similitud genética encontrada en los patrones para las *E. coli* de ambos grupos fue de 42 a 100% para **Vs** y de 35 a 100% para **Vtr**.

Se consideró que aquellos aislados provenientes del mismo animal que presentaron patrones con similitud $\geq 90\%$ tienen un origen clonal común. Tal situación fue observada en 2 aislados del grupo **Vs** provenientes de la vaquillona 10 y otros 2 de la vaquillona 12; mientras que en el grupo **Vtr**, en 2 aislados de la vaca 3204.

En el grupo **Vs** se detectó una mayor cantidad de patrones diferentes correspondientes a un mismo animal (7-1 perfiles clonales diferentes/animal); 6/11 animales exhibieron más de 5 perfiles distintos. Con respecto a **Vtr** se identificó un menor número de patrones por animal, donde solo un animal presentó 5 perfiles diferentes mientras que 15/23 tuvieron 1-2 patrones distintos (**Figura 6**).



4.4. CONFORMACIÓN FILOGENÉTICA

Con el objetivo de caracterizar filogenéticamente a los aislados de *E. coli* se clasificó a los mismos en cuatro grupos (Clermont y col., 2000) como se describió previamente (ítem 3.8.) (Figura 7).

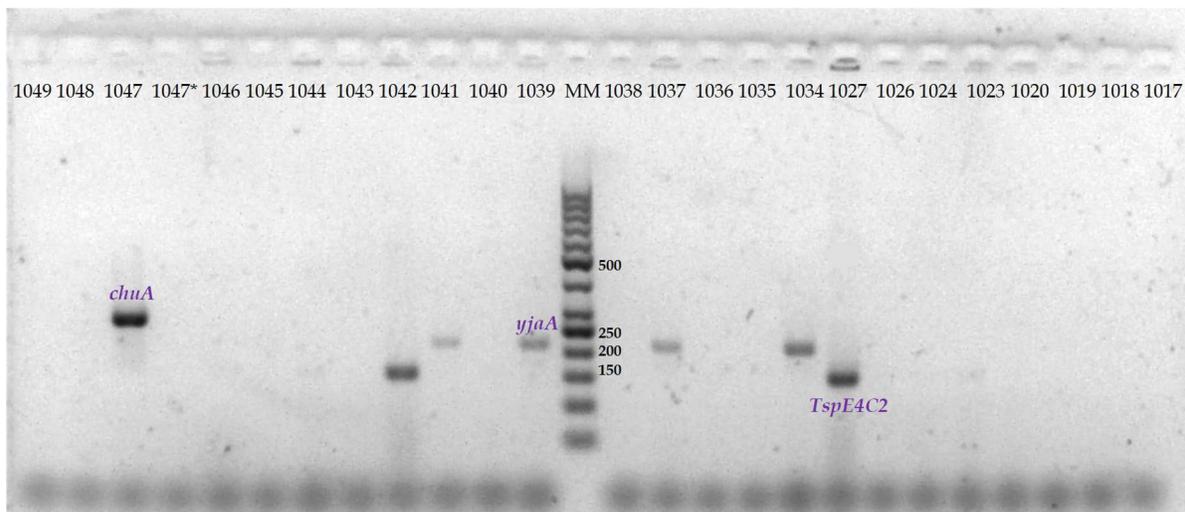


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa (2%) de los productos de amplificación utilizando cebadores específicos de los genes *chuA* y *yjaA*, y del fragmento TspE4C. MM: marcador de peso molecular de ADN de 50 pb.

Los resultados indicaron que los aislados vaginales bovinos estudiados pertenecen a los grupos filogenéticos A (74,23%), B1 (17,35%) y D (8,25%); asimismo, ningún aislado fue clasificado como B2. La prevalencia del grupo filogenético A fue significativamente mayor ($P < 0,05$, prueba exacta de Fisher) que B1 y D; sin embargo, no hubo diferencias significativas entre estos dos últimos.

La distribución porcentual de los filogrupos en las poblaciones de *E. coli* aisladas de cada grupo de animales se muestra en la **Figura 8**. En cada población se mantiene la tendencia general de prevalencia $A > B > C$; sin embargo, la prevalencia de B1 en **Vr** (29%) fue mayor que en **Vmt** (18%) y en **Vs** (8%).

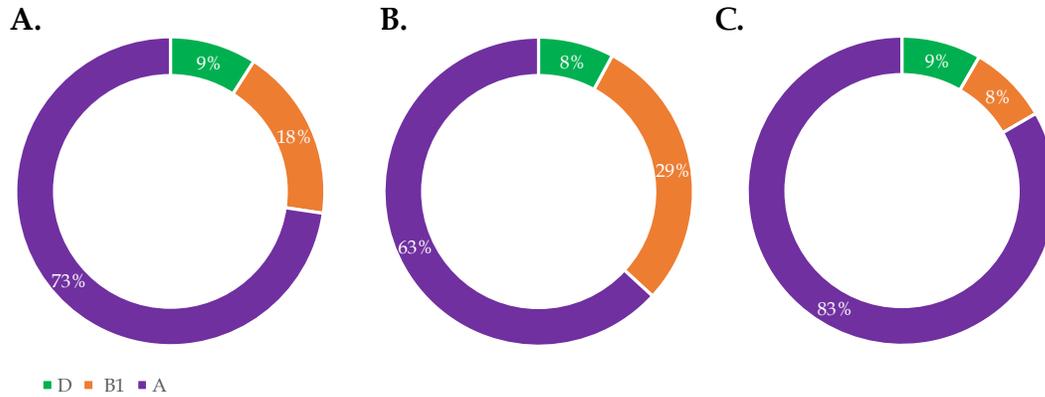


Figura 8. Clasificación filogenética de las *E. coli* aisladas de vagina de: vacas con enfermedad uterina (**A**), vacas repetidoras de celos (**B**) y vaquillonas sanas (**C**).

El análisis de correspondencia reveló que existe asociación entre la condición clínica-reproductiva de los animales muestreados y la prevalencia de los grupos filogenéticos. Solamente se detectó asociación significativa ($P < 0,0215$, Chi cuadrado de Pearson) entre el filogrupo **B1** y las *E. coli* aisladas de vacas **Vr** (**Figura 9**).

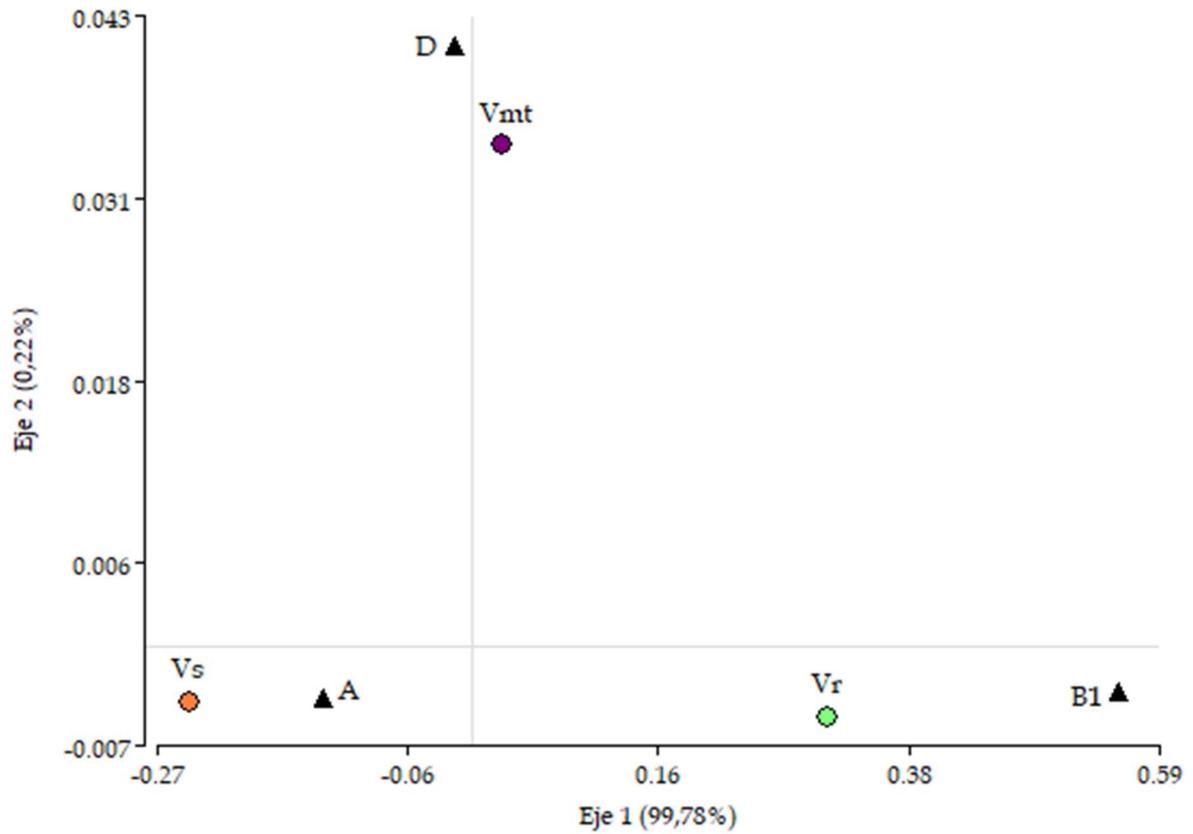


Figura 9. Análisis de correspondencia de la distribución de los filogrupos y las condiciones clínico-reproductivas de las hembras. Se indica entre paréntesis la contribución a chi cuadrado.

CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL DE PATOGENICIDAD DE *Escherichia coli* VAGINALES BOVINAS

4.5. ETAPA 1: RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y PRESENCIA DE FACTORES DE VIRULENCIA ASOCIADOS A *Escherichia coli* ENTEROPATÓGENA

4.5.1. RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS

Los resultados de la evaluación de la resistencia a los antimicrobianos se analizaron teniendo en cuenta el perfil clínico-reproductivo de los animales. De esta manera, se estudiaron tanto las muestras provenientes de vaquillonas vírgenes sanas, así como de vacas con trastornos reproductivos (**Figura 10**). La totalidad de los aislados fueron sensibles a amoxicilina-ácido clavulánico, ceftazidima y ceftiofur. La mayoría fue sensible también a sulfametoxazol/trimetoprima (el 100% de aislados de vacas del grupo **Vtr** y más del 95,7% de los de vaquillonas pertenecientes a **Vs**).

La mayor prevalencia de resistencia se encontró frente a los siguientes antibióticos: enrofloxacina, ampicilina, estreptomina y tetraciclina, siendo la resistencia a este último antibiótico significativamente ($P < 0,05$ prueba exacta de Fisher) mayor en los aislados provenientes de vacas **Vtr** (Tabla 6).

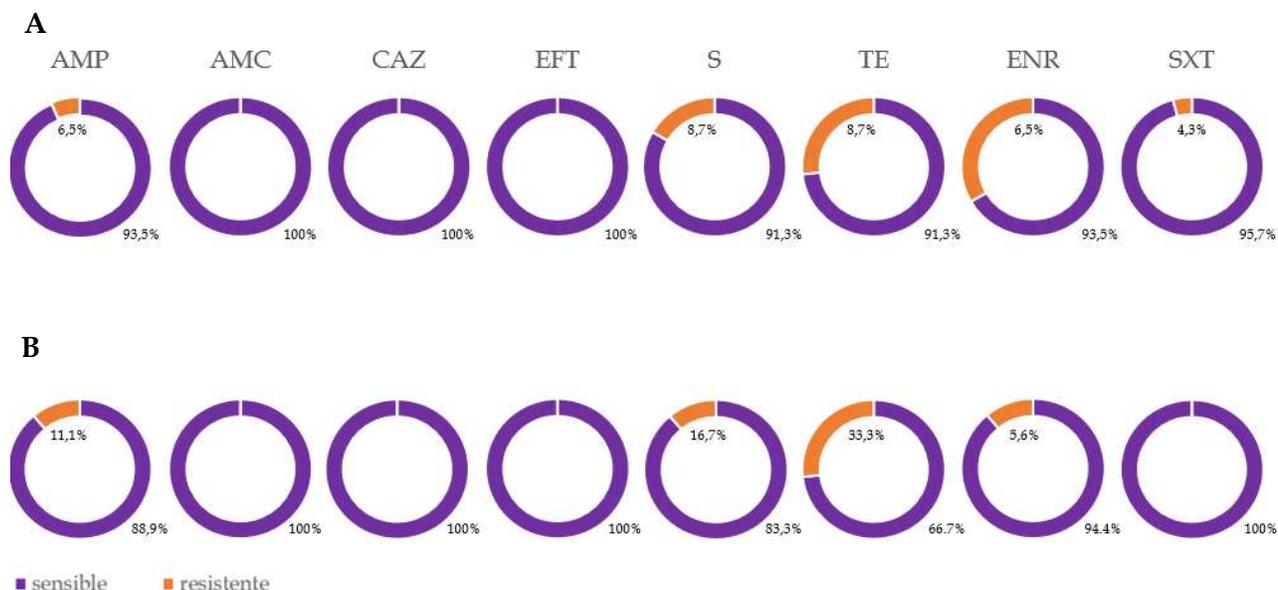


Figura 10. Porcentajes de aislados de *E. coli* Sensibles (naranja) y Resistentes (verde) a los antibióticos ensayados: AMP (Ampicilina), AMC (Amoxicilina/Ác. Clavulánico), CAZ (Ceftazidima), EFT (Ceftiofur), S (Estreptomicina), TE (Tetraciclina), ENR (Enrofloxacina), STX (Sulfametoxazol/Trimetoprima). **A.** Vaquillonas sanas y **B.** Vacas con trastornos reproductivos.

Tabla 6. Prevalencia de resistencia a agentes antimicrobianos entre aislamientos de *E. coli* de vaquillonas sanas (Vs) y vacas con trastornos reproductivos (VTR).

Agente Antimicrobiano	VTR n (%)	Vs n (%)	OR (95% CI)
Ampicilina (AMP)	2 (11,11)	3 (6,52)	0,56 (0,10 – 3,11)
Estreptomicina (S)	3 (16,67)	4 (8,70)	0,48 (0,10 – 2,16)
Tetraciclina (TE)	6 (33,33)	4 (8,70)	0,19 (0,05 – 0,74)*
Enrofloxacina (ENR)	1 (5,56)	3 (6,52)	1,19 (0,16 – 8,69)
Sulfametoxazol/Trimetoprima (SXT)	0 (0)	2 (4,35)	-
Perfil de susceptibilidad antimicrobiana			
Resistente	8 (44,44)	6 (13,04)	0,19 (0,06 – 0,64)*
Susceptible	10 (55,56)	40 (86,96)	
MDR#	1 (5,56)	2 (4,35)	0,77 (0,09 – 6,30)
NMDR†	17 (94,44)	44 (95,65)	

* indica diferencias significativas (P<0,05 prueba exacta de Fisher). #MDR: multiresistentes ; †NMDR: no multiresistentes.

Para un mejor análisis del comportamiento de los aislados del TRB frente a los antibióticos, se consideraron “multirresistentes” (MDR) a aquellos aislados que presentaron resistencia frente a antibióticos de por lo menos dos grupos diferentes (Magiorakos y col., 2012), mientras que los aislados que fueron resistentes a un sólo tipo de antibiótico se consideraron como “no multirresistentes” (NMDR). Los resultados mostraron diferencias significativas ($P < 0,05$ Prueba exacta de Fisher) en la distribución de aislamientos con resistencia al menos a un agente antimicrobiano, ya que se observó una mayor prevalencia en los aislamientos de vacas **Vtr** ($P = 0,0005$). El mayor porcentaje de aislados definidos como multirresistentes se detectó en las muestras de **Vtr** (**Figura 11**). El resultado opuesto fue observado para *E. coli* sensibles, siendo mayor su proporción en **Vs**.

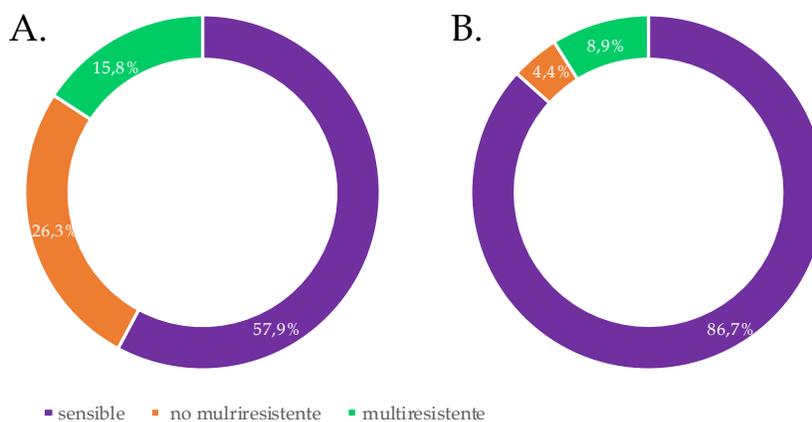


Figura 11. Distribución de los aislados con perfiles: (**sensible**) sensible a todos los antibióticos evaluados, (**no multirresistencia**) resistente a sólo un tipo de antibiótico y (**multirresistencia**) resistente al menos a dos antibióticos de diferente tipo. **A.** Vacas con trastornos reproductivos y **B.** Vaquillonas sanas.

4.5.2. PRESENCIA DE GENES ASOCIADOS A FACTORES DE VIRULENCIA DE *Escherichia coli* ENTEROPATÓGENICAS

En esta etapa se eligieron 60 aislados de *E. coli*, seleccionados al azar, para evaluar presencia de cuatro determinantes de virulencia intestinal. Los resultados

develaron que el 17,8% de los aislados evidenciaron la presencia de al menos un factor. Cabe destacar que en los aislados obtenido a partir de **Vtr** no se detectó ningún FV. Asimismo, el gen intimina (*eae*) fue detectado sólo en el 3 % de los aislamientos de **Vs** mientras que el gen de la enterotoxina termoestable (*STa*) y el gen que codifica para la fimbria F41 se detectaron en el 3,13 y 7,81% de los aislados de este mismo grupo, respectivamente. Sin embargo, ningún aislamiento fue positivo para el gen de la fimbria F5. Sólo una *E. coli* de **Vs** se consideró potencialmente patógeno, ya que tenía al menos un factor de adherencia (*F41*) y una toxina (*STa*) de acuerdo con lo descrito por Herrero-Fresno y col. (2015).

4.6. ETAPA 2: EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE GENES ASOCIADOS A FACTORES DE VIRULENCIA DE *Escherichia coli* EXTRA-INTESTINALES

La presencia de 11 genes de virulencia asociados con ExPEC fue evaluada mediante PCR en los 97 aislamientos de *E. coli*: *fimH*, *papC*, *sfa/focDE*, *csgA*, *afa/draBC*, *fyuA*, *iutA*, *hlyA*, *traT*, *kpsMT II* y *agn43*. Cuatro de ellos, *papC*, *sfa/focDE*, *afa/draBC* y *iutA*, dieron reacciones negativas para todos los microorganismos evaluados (**Figura 12**).

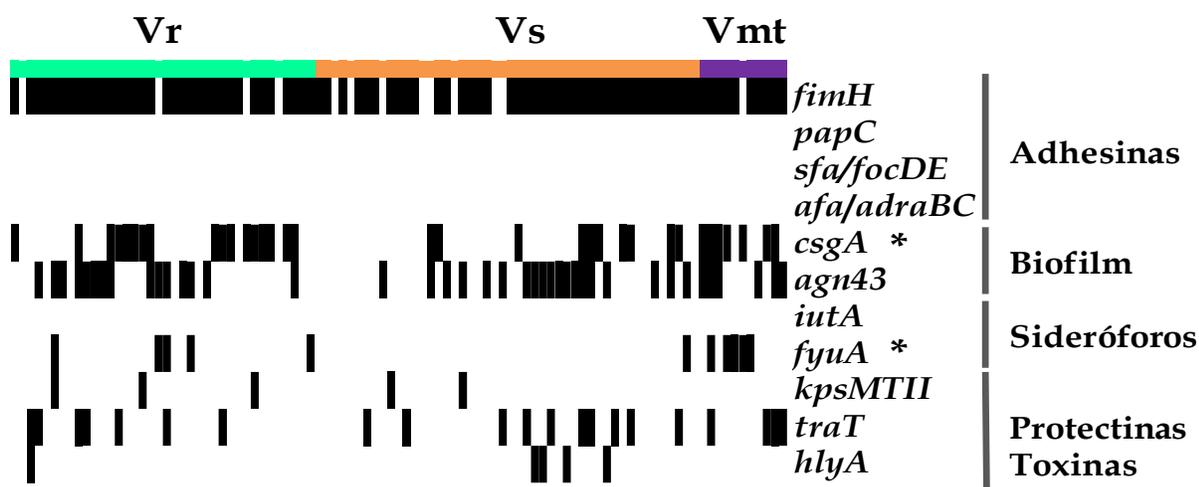


Figura 12. Presencia de 11 FV de *E. coli* ExPEC en aislados de Vacas con enfermedad uterina (**Vmt**), Vacas repetidoras de celo (**Vr**) y Vaquillonas sanas (**Vs**). La matriz a la derecha indica detección positiva o negativa*: indica diferencias significativas ($P < 0,05$, prueba de suma de rangos de Wilcoxon).

En general, de los FV evaluados, el más frecuente entre los aislados de *E. coli* del TRB fue *fimH* (86,6%), seguido de *agn43* (41,2%) y *csgA* (35,1%), que codifican para factores asociados adhesina, formación de biofilm y producción de fimbria curly, respectivamente. También se detectaron, aunque en menor proporción, los genes de *traT* (21,6%), *fyuA* (11,3%), *hlyA* (5,2%) y *kpsMT II* (5,2%).

Al estudiar la asociación existente entre los FV y los grupos de animales muestreados, se observó que la prevalencia del gen *fyuA* fue significativamente mayor ($P < 0,05$, Prueba exacta de Wilcoxon) en *E. coli* obtenidas de vacas con enfermedad uterina (**Vmt**) en concordancia con lo previamente descrito por Sheldon y col. (2010) quienes detectaron la prevalencia de este gen en el 72% de los aislados de vacas con metritis postparto (**Figura 12**). Además, se observó una asociación significativa entre el gen *csgA* y las vacas con trastornos uterinos (**Vr** y **Vmt**) ($P < 0,05$ Prueba exacta de Wilcoxon).

Para evaluar si existía alguna asociación entre la presencia de genes de FV y alguno de los filogrupos detectados, se aplicó un análisis multivariado; mediante el cual se evidenció la relación entre los aislados de las vacas con trastornos reproductivos (enfermedad uterina y SVR), el grupo filogenético B1 y los FV *fyuA* y *csgA* (**Figura 13**).

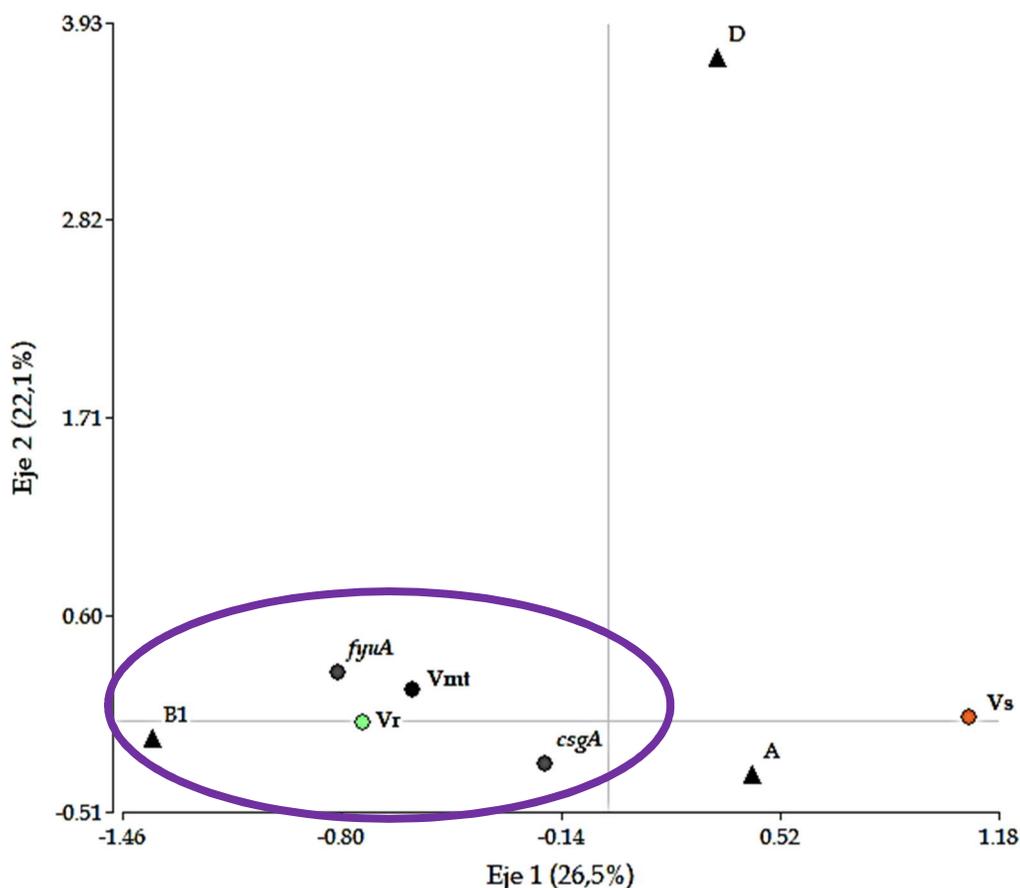


Figura 13. Asociación entre los grupos filogenéticos y presencia de genes asociados a FV extraintestinales en *E. coli* del TRB.

Se calculó un *score* de “FV agregado” para cada aislamiento (en una escala 0 a 5), el cual, en base al número total de FV detectados, predice la virulencia experimental *in vivo* (Kudinha y col., 2012). En general, el *score* agregado de FV varió ampliamente entre los aislados analizados (de 0 a 5). El estudio del perfil de los aislados (Tabla 7) reveló que un total de 7 de ellos fueron negativos a todos los FV estudiados, 5 de los cuales pertenecían al grupo de Vs y 2 a los de Vr, y solo 1 aislamiento de Vmt tuvo *score* 5.

En el grupo con *score* 0 a 2, encontramos el 73, 63 y 36% de los aislados Vs, Vr y Vmt, respectivamente; mientras que en el grupo con *score* 3 a 5 se detectaron el 63, 27 y 27% de los aislados de Vmt, Vr y Vs, respectivamente.

Las combinaciones de FV y filogrupos arrojaron 52 patrones, con 20 combinaciones compartidas por dos o más *E. coli*; por lo que no pudo determinarse ninguna asociación de las combinaciones con los grupos de animales (Tabla 7).

Tabla 7. Perfil de los aislados de *E. coli* del TRB con respecto al grupo de animales, filogrupo y la detección de genes de virulencia extraintestinales.

Grupo	Filogrupo	Factores de Virulencia	Número
Vs*	A	-	3
Vs	B1	-	2
Vr	A	-	1
Vr	B1	-	1
Vs	A	<i>fimH</i>	11
Vs	A	<i>agn43</i>	1
Vs	B1	<i>fimH</i>	2
Vs	D	<i>fimH</i>	1
Vr#	A	<i>fimH</i>	5
Vr	B1	<i>fimH</i>	1
Vr	B1	<i>csgA</i>	1
Vs	A	<i>csgA, agn43</i>	1
Vs	A	<i>agn43, traT</i>	1
Vs	A	<i>fimH, csgA</i>	4
Vs	A	<i>fimH, agn43</i>	3
Vs	A	<i>fimH, kpsMTII</i>	1
Vs	A	<i>fimH, traT</i>	2
Vs	D	<i>fimH, agn43</i>	2
Vs	D	<i>fimH, traT</i>	1
Vr	A	<i>fimH, csgA</i>	6
Vr	A	<i>fimH, agn43</i>	3
Vr	B1	<i>fimH, csgA</i>	2
Vr	B1	<i>fimH, agn43</i>	1
Vr	B1	<i>fimH, fyuA</i>	1
Vr	D	<i>fimH, agn43</i>	1
Vr	D	<i>agn43, fyuA</i>	1
Vmt†	A	<i>fimH, fyuA</i>	2

Tabla 7 (continuación). Perfil de los aislados de *E. coli* del TRB con respecto al grupo de animales, filogrupo y la detección de genes de virulencia extraintestinales.

Vmt	A	<i>csgA, fyuA</i>	1
Vmt	D	<i>fimH, agn43</i>	1
Vs	A	<i>fimH, csgA, agn43</i>	1
Vs	A	<i>fimH, csgA, traT</i>	2
Vs	A	<i>fimH, agn43, hlyA</i>	4
Vs	A	<i>fimH, agn43, kpsMTII</i>	1
Vs	A	<i>fimH, agn43, traT</i>	2
Vs	A	<i>fimH, agn43, fyuA</i>	1
Vr	A	<i>fimH, csgA, agn43</i>	1
Vr	A	<i>fimH, csgA, kpsMTII</i>	2
Vr	A	<i>fimH, csgA, traT</i>	2
Vr	A	<i>fimH, agn43, traT</i>	1
Vr	A	<i>fimH, agn43, fyuA</i>	1
Vr	B1	<i>fimH, csgA, agn43</i>	1
Vr	B1	<i>fimH, hlyA, traT</i>	1
Vr	D	<i>fimH, csgA, agn43</i>	1
Vmt	A	<i>fimH, csgA, agn43</i>	2
Vmt	A	<i>fimH, csgA, fyuA</i>	1
Vmt	A	<i>fimH, agn43, traT</i>	1
Vmt	B1	<i>fimH, csgA, traT</i>	1
Vs	A	<i>fimH, csgA, agn43, traT</i>	2
Vr	A	<i>fimH, agn43, traT, fyuA</i>	1
Vr	A	<i>fimH, csgA, agn43, traT</i>	1
Vr	B1	<i>fimH, agn43, kpsMTII, fyuA</i>	1
Vmt	A	<i>fimH, csgA, agn43, traT</i>	1
Vmt	B1	<i>fimH, csgA, agn43, traT, fyuA</i>	1

*Vs: Vaquillona sana; #Vr: Vaca repetidora de celo; †Vmt: Vaca con enfermedad uterina

El análisis de componentes principales (CP), basado en la presencia de FV, agrupó a los aislados de *E. coli* en dos grupos que incorporan un 100% de variación acumulativa: el CP1 explicó el 81,2% de la variación, mientras que el CP2 explicó el

18,8% de la variación (**Figura 14**). El trazado de CP1 contra CP2 para la evaluación visual reveló tendencias en la diferenciación y formación de grupos con un patrón genético similar. Varios genes diferentes, tales como *fyuA*, *csgA*, *agn43* y *hlyA* se cargaron en gran medida en CP1; los 3 primeros se asociaron al grupo **Vmt** y el último a **Vs**, mientras que *kpsMTII* principalmente determinó la carga para CP1 relacionándose fuertemente con el grupo **Vr**.

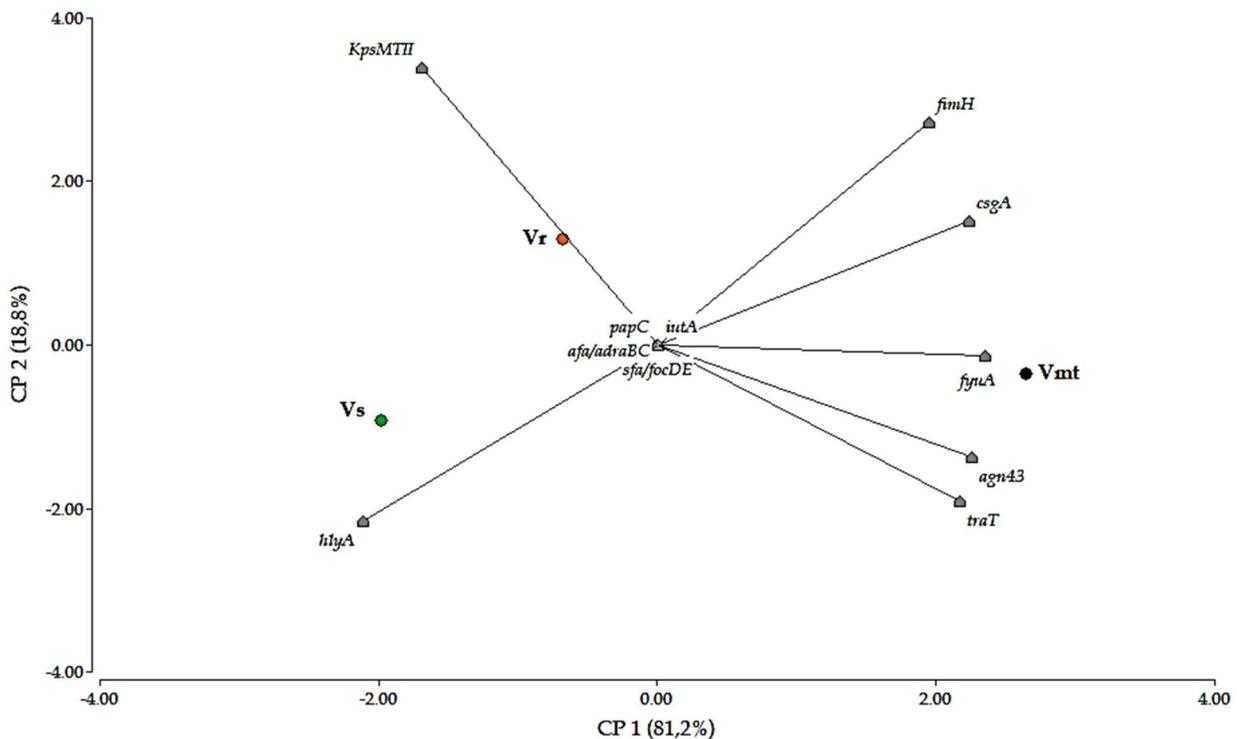


Figura 14. Análisis de componentes principales basado en la detección de FV. Se incluyeron los tres grupos de animales muestreados: Vacas con enfermedad uterina (**Vmt**), Vacas repetidoras de celo (**Vr**) y Vaquillonas sanas (**Vs**).

4.7. ETAPA 3: EXPRESIÓN DE PROPIEDADES ASOCIADAS A PATOGENICIDAD EN *Escherichia coli*

4.7.1. HEMÓLISIS

Ninguno de los aislados de *E. coli* estudiados fue capaz de producir α o β -hemólisis.

4.7.2. FACTORES ASOCIADOS A ADHESIÓN Y COLONIZACIÓN

a- MOVILIDAD

Los resultados indicaron mayor movilidad en la población de *E. coli* aisladas de vagina de vacas **Vmt**, entre las cuales se observa el mayor porcentaje de aislados con movilidad alta (36%) y el menor porcentaje de microorganismos inmóviles (9%) (**Figura 15**). En los aislados de **Vr** se detectó un 16% de aislados con alta movilidad y un 29% de inmóviles, el 55% restante se repartió entre otros grados de movilidad; mientras que en la población de **Vs** se observa una distribución uniforme de los fenotipos categorizados, con aproximadamente un 25% de prevalencia media de cada uno (**Figura 15**).

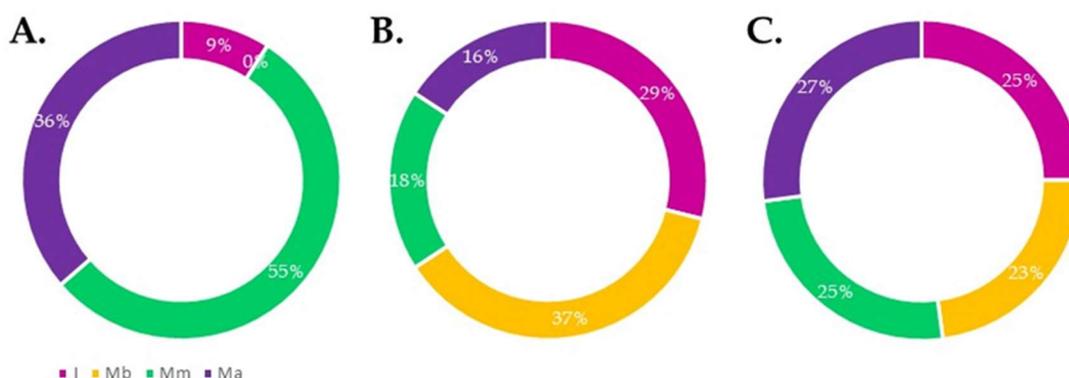


Figura 15. Movilidad de *E. coli* aisladas de: (A) Vacas con enfermedad uterina (**Vmt**), (B) Vacas repetidoras de celo (**Vr**) y (C) Vaquillonas sanas (**Vs**). Categoría: (I) Inmóvil, (Mb) movilidad baja, (Mm) movilidad media y movilidad alta (Ma).

El análisis estadístico (Chi cuadrado de Pearson) fue realizado clasificando a los aislados como **movilidad positiva** (Ma, Mm) y **negativa** (I y Mb), los resultados indicaron que la movilidad fue significativamente diferente entre aislados provenientes de los distintos grupos de animales (**Tabla 8**). El porcentaje de aislados con movilidad positiva fue significativamente mayor en las poblaciones de *E. coli* provenientes del grupo **Vmt** en comparación con las del grupo **Vs** y las del **Vr** ($P < 0,005$). Asimismo, no se observaron diferencias significativas entre los grupos **Vr** y **Vs**.

Tabla 8. Formación de biofilm, producción de fimbria curly/celulosa y movilidad de *E. coli* del TRB de: Vaquillonas sanas (Vs), Vacas con enfermedad uterina (Vmt) y Vacas repetidoras de celo (Vr).

Fenotipo (n=97 aislados)	Grupos		
	Vs, n (%)	Vmt, n (%)	Vr, n (%)
Movilidad	25 (52,1) ^a	10 (90,9) ^b	13 (34,2) ^a
Producción de fimbria curly/celulosa	29 (60,4) ^a	7 (63,6) ^a	30 (79) ^a
Formación de biofilm	29 (60,4) ^a	10 (91) ^b	32 (84,2) ^b

^{ab} (Los datos categóricos se analizaron mediante prueba de chi-cuadrado para columnas).

b- EXPRESIÓN DE FIMBRIA CURLY Y/O CELULOSA

La expresión de fimbria curly fue mayor en los aislados del grupo **Vr** (79%), mientras que el 63.6% y el 60,4 % de los grupos **Vmt** y **Vs** fueron positivos, respectivamente (**Tabla 8**). Sin embargo, el análisis estadístico indicó que no hubo diferencias significativas bajo las condiciones de estudio utilizadas.

c- FORMACIÓN DE BIOFILM

La formación de biofilm obtenida sobre superficies abióticas (vidrio y poliestireno) se evaluó a partir de los valores de DO_{590nm} obtenidos (**Figura 16**). Se utilizaron ambos soportes a fin de determinar la capacidad de formar biopelículas, independientemente de la naturaleza de la superficie. El análisis de los resultados indicó que la DO varió significativamente dependiendo de la superficie sobre la que se desarrolló el biofilm (efecto “superficie”, $P \leq 0,0001$). En base a la mayor amplitud del rango de valores de biofilm obtenidos sobre vidrio, se decidió continuar evaluando la capacidad de producción de biofilm sobre dicha superficie.

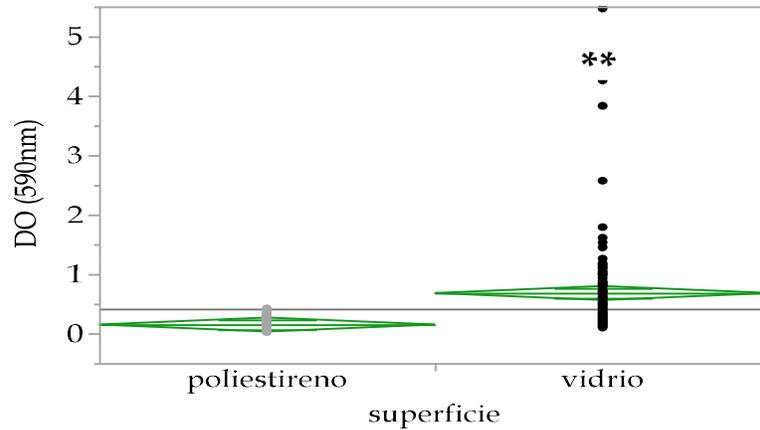


Figura 16. Formación de biofilm de los aislados de *E. coli* sobre poliestireno y vidrio. **: indican diferencias significativas ($P < 0,0001$, prueba t de Student).

Seguidamente, se determinaron los puntos de corte para categorizar los resultados de la capacidad de formación de biofilm, teniendo en cuenta la distribución de los valores (DO_{590nm}) obtenidos sobre vidrio, para la totalidad de los aislados ensayados (**Figura 17**). Así, la mayoría de los valores obtenidos estuvieron comprendidos en el rango de 0,24 a 0,82 por lo que se definió el siguiente score de capacidad de formación de biofilm: bajo $< 0,24$, medio: 0,24 a 0,82, y alto $> 0,82$.

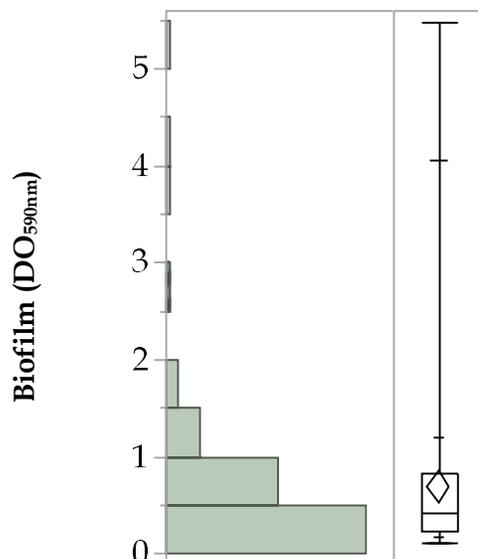


Figura 17. Distribución de valores de producción de biofilm sobre vidrio: valor de mediana=0,42; cuartiles: Q1=0,24 y Q3=0,82, que definen el IQ (intervalo intercuartil) de los valores de capacidad media de formación de biofilm.

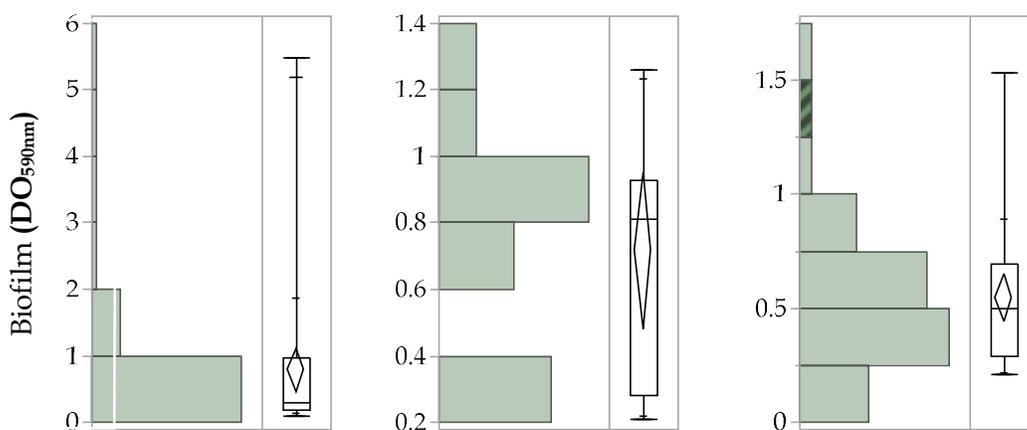


Figura 18. Distribución de valores de producción de biofilm sobre vidrio obtenidos por *E. coli* aisladas de: (A) Vaquillonas sanas (Vs), (B) Vacas con enfermedad uterina (Vmt) y (C) Vacas repetidoras de celo (Vr).

Al comparar la capacidad de formación de biofilm de los aislados provenientes de diferentes grupos de animales, se observó que las *E. coli* de Vr mostraron un comportamiento más homogéneo a diferencia de aquellas provenientes de los grupos Vmt y Vs. Estas últimas tuvieron un comportamiento más heterogéneo, lo cual queda

demostrado por los valores de rango intercuartil de los tres grupos: IQ=0,408; 0,65 y 0,775, para **Vr**, **Vmt** y **Vs**, respectivamente (**Figura 18**).

Para las comparaciones en el análisis estadístico, se consideró: biofilm negativo (valores <0,24) y positivo (valores >0,24). Se observa que en el grupo **Vmt** existe un mayor número de aislados productores de biofilm, lo que se deduce a partir de un mayor valor de mediana. Sin embargo, en la **Figura 18** se puede evidenciar que algunos aislados del grupo **Vs** presentan una alta capacidad de formación de biofilm (extensión del bigote superior 5,47). En coincidencia con lo observado, la expresión de esta propiedad fue significativamente mayor ($P < 0,03$, T test, IC 95% para la diferencia) en el grupo **Vmt** que en el de **Vs** (**Tabla 8**). Lo mismo fue observado al comparar los resultados entre los grupos **Vr** y **Vs** ($P < 0,01$, T test, IC 95% para la diferencia), no así entre los grupos **Vtr** (**Vmt** y **Vr**) donde no hubo diferencias significativas ($P = 0,57$, T test, IC 95% para la diferencia).

La comparación de la expresión de la formación de biofilm con las dos propiedades descritas anteriormente se realizó mediante un análisis de correspondencia entre formación de biofilm, expresión de fimbria curly/producción de celulosa y movilidad, con los diferentes perfiles clínicos evaluados: **Vs**, **Vmt** y **Vr** (**Figura 19**). Se observa una asociación entre formación de biofilm y producción de fimbria curly/celulosa negativos con el grupo **Vs**, mientras que sus valores positivos se asociaron en mayor medida con **Vmt**. El grupo **Vr** por su parte mostró asociación positiva con la formación de biofilm, producción de fimbria curly/celulosa.

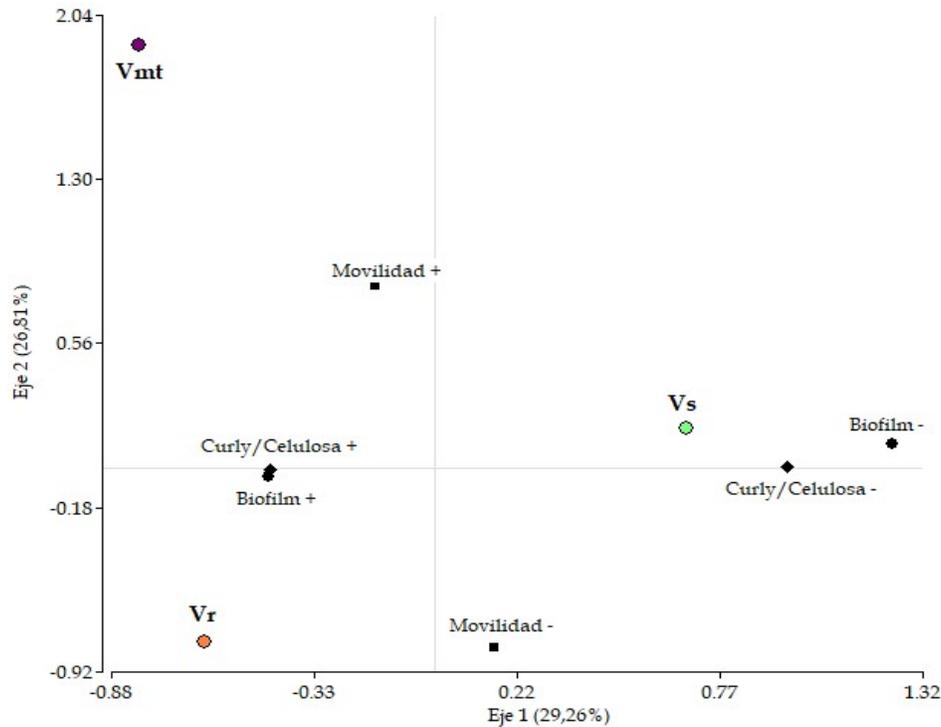


Figura 19. Análisis de correspondencia de la formación de biofilm, expresión de fimbria curly/producción de celulosa y movilidad de aislados de *E. coli* de: (Vs) Vaquillonas sanas, (Vmt) Vacas con enfermedad uterina y (Vr) Vacas repetidoras de celo. Se indica entre paréntesis la contribución a chi cuadrado.

d- EXPRESIÓN DE FIMBRIA TIPO 1 Y P

El análisis de la expresión de la fimbria tipo 1 presentó resultados diferentes según las condiciones clínico-reproductivas de los animales muestreados. Como se observa en la **Figura 20**, bajo las condiciones de estudio utilizadas, hubo una mayor prevalencia de *E. coli* positivos sensibles a manosa (PS) en los aislados de **Vmt**. Por otro lado, la prevalencia de aislados positivos resistentes a manosa (PR) fue mayor en el grupo Vs.

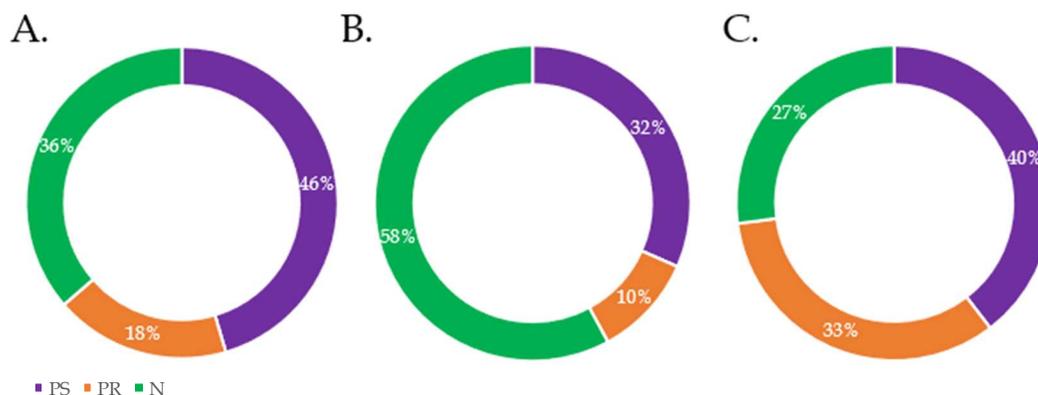


Figura 20. Aglutinación de levaduras por *E. coli* del TRB de: (A) Vacas con enfermedad uterina (Vmt), (B) Vacas repetidoras de celo (Vr) y (C) Vaquillonas sanas (Vs). (N) Aglutinación negativa, (PR) Aglutinación positiva resistente a manosa y (PS) Aglutinación positiva sensible a manosa.

La hemoaglutinación resistente a manosa fue positiva para un solo aislado perteneciente al grupo Vs bajo las condiciones experimentales utilizadas.

El análisis de la prevalencia de la expresión de la Fimbria tipo 1 y Fimbria P indica que no existen diferencias significativas entre los grupos Vtr (Vmt y Vr) y Vs incluidos en el estudio (Tabla 9).

Tabla 9. Relación entre el grupo de animales muestreado y expresión de la fimbria tipo 1 y P de los aislados de *E. coli* del TRB de: Vaquillonas sanas (Vs), Vacas con enfermedad uterina (Vmt) y Vacas repetidoras de celo (Vr).

Fenotipo (n=97)	Grupos		
	Vs, n (%)	Vmt, n (%)	Vr, n (%)
Fimbria tipo 1	19 (39,6)	5 (45,4)	12 (31,6)
Fimbria P	1 (2,1)	-	-

5. DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio muestran, por primera vez, la caracterización del perfil potencial de virulencia de *E. coli* vaginales de vaquillonas sanas (**Vs**) y vacas repetidoras de celo (**Vr**), y se comparan con las de vacas con enfermedad uterina posparto (**Vmt**).

Si bien *E. coli* fue descrita como un constituyente de la microbiota normal del TR de vaquillonas sanas (Otero y col., 2000), es una de las bacterias más comúnmente aislada del útero en el posparto temprano y posee un rol decisivo en el establecimiento de la metritis (Sheldon y col., 2002; Miller y col., 2007; Williams y col., 2007). Se ha descrito que la presencia de *E. coli* en el útero de posparto temprano se asocia a reacción inflamatoria, descarga vulvar purulenta, metritis y problemas en la restauración del estro (Bicalho y col., 2012). Sin embargo, la caracterización del perfil de virulencia de *E. coli* endometrio-patogénicas aún no es concluyente ya que todavía no hay consenso entre los investigadores (Silva y col., 2009; Bicalho y col., 2010; Sheldon y col., 2010; Kassé y col., 2016). Asimismo, a la fecha, ningún trabajo científico había aislado y caracterizado *E. coli* del TRB de vacas con problemas de fertilidad luego de 6 meses posparto como en el SVR.

La plasticidad del genoma es el principal impulsor de la diversidad fenotípica y de la evolución de *E. coli* (Johnson y col., 2005). El alto dinamismo de su genoma es responsable de las diferencias relevantes observadas entre las cepas patógenas asociadas a enfermedades (Pompilio y col., 2018). Se han desarrollado varias técnicas moleculares para identificar y clasificar bacterias, más allá del nivel de la especie, con el fin de ayudar a distinguir las bacterias no patógenas de sus contrapartes causantes de la enfermedad, así como clasificar grupos de cepas estrechamente relacionadas. La más confiable o "gold standard" de las metodologías es la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), sin embargo, se trata de una técnica muy costosa (Fox y col., 2012), por lo que en este trabajo de tesis se recurrió a otros métodos de tipificación basados en PCR, que permiten la identificación de cepas bacterianas así como la evaluación de las relaciones genéticas que comparten. En este sentido, dos métodos de tipificación

basados en PCR comunes incluyen el uso de la amplificación aleatoria del ADN polimórfico amplificado aleatorio (en inglés *Random amplified polymorphic DNA*: RAPD) y amplificación de elementos repetitivos (en inglés *Repetitive Extragenic Palindromic*: REP). La técnica de RAPID-PCR crea un patrón de bandas único para cada cepa bacteriana (Olive & Bean, 1999); aunque simple en diseño y teoría, esta herramienta tiene sus defectos que llevan a una cuestionable reproducibilidad y dificulta la estandarización (Olive & Bean, 1999). La REP-PCR, a diferencia de RAPD, apunta a elementos bien definidos del ADN que se repite frecuentemente en todo el genoma. Se trata de elementos repetitivos comunes entre los procariotas y están altamente conservados en cada generación. Así, a través de la utilización de cebadores específicos, se puede amplificar estos elementos repetitivos formando en la electroforesis un patrón de bandas único para cada especie y cepa bacterianas (Versalovic y col., 1991). Si bien se han identificado varios elementos repetitivos, existen dos secuencias repetidas que son utilizadas como blanco de esta técnica con mayor frecuencia: secuencias REP y ERIC-PCR, según lo descrito por Versalovic y col. (1991). En este sentido, varias investigaciones han utilizado ERIC-PCR como una herramienta de *fingerprinting* genómica altamente sensible para detectar y determinar diferentes cepas de *E. coli* (Ardakani y col., 2016; Sekhar y col, 2017). Soltani y col. (2012) confirmaron que ERIC-PCR es una buena técnica para el genotipado bacteriano entre las herramientas moleculares simples y económicas. En el presente estudio, por lo tanto, se la ha empleado utilizando el cebador ERIC2, según lo previamente descrito por Ateba & Mbewe (2014) y Dyer y col. (2007), quienes analizaron la asociación clonal de *E. coli* aisladas de muestras animales. El análisis de los resultados obtenidos con un punto de corte $\geq 90\%$ de similitud, permitió apreciar que en las poblaciones de *E. coli* que residen en vagina de **Vs** la diversidad genética es mayor, comparada con lo observado en vacas con trastornos reproductivos (**Vmt** y **Vr**) en las cuales se observó mayor homogeneidad, lo que estaría indicando orígenes clonales comunes; probablemente las poblaciones de *E. coli* vaginales son inicialmente diversas y como consecuencia del manejo animal, se seleccionan determinadas poblaciones. Esta situación puede representar un factor de

riesgo de enfermedad. En mujeres con mayor riesgo de desarrollar ITU recurrentes, se reportó la existencia de una microbiota uretral con poblaciones menos diversas en comparación con aquellas pacientes que no desarrollan tal complicación (Whiteside y col., 2015).

El análisis filogenético ha sido previamente utilizado para evaluar los orígenes evolutivos de *E. coli* patógenas aisladas del útero bovino de posparto, donde el grupo predominante fue B1 sobre A y D (Silva y col., 2009; Sheldon y col., 2010). Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis indicaron que la conformación filogenética de las poblaciones de *E. coli* nativas de vagina bovina están constituidas principalmente por el filogrupo A (74,23 %) y B1 (17,35 %) y, en menor proporción, por el D (8,25 %). Sin embargo, ningún aislado fue clasificado en el filogrupo B2, lo que está en concordancia con lo previamente reportado por Silva y col. (2009). La discrepancia entre lo observado en este trabajo y lo reportado por otros autores (Silva y col., 2009; Sheldon y col., 2010) respecto del grupo filogenético mayoritario (filogrupo A) puede deberse a que en este trabajo hemos evaluado a las poblaciones de *E. coli* que provienen no solo de vacas postparto, sino también de vaquillonas sanas, estando estas últimas asociadas al filogrupo A. Este último, junto al filogrupo B1 fueron reportados en *E. coli* comensales (Johnson & Stell, 2000). Los resultados presentados indicaron asociación significativa entre las vacas Vr y el filogrupo B1. Nuestros hallazgos junto a los reportados previamente (Silva y col., 2009; Sheldon y col., 2010) destacan la importancia de estudiar más detalladamente las características de las poblaciones B1 que residen en vagina, a fin de determinar si tienen algún rol en la aparición de cepas de riesgo endometrio-patogénico.

Se ha reportado que *E. coli* se encuentra con frecuencia en el útero de vacas en el período posparto temprano, alterando el ambiente uterino de tal manera que permite la infección por otras bacterias oportunistas (Dohmen y col., 2000; Williams y col., 2007; Sheldon y col., 2010; Bicalho y col., 2012; Kassé y col., 2016) y la aparición de lesiones uterinas graves y posterior infertilidad (Sheldon y col., 2002; Williams y col., 2007). Si bien varios estudios han intentado dilucidar el papel de *E. coli* en el desarrollo de las

infecciones uterinas postparto a través de la caracterización de su perfil de patogenicidad, los resultados obtenidos han sido variables (Silva y col., 2009; Bicalho y col., 2010; Sheldon y col., 2010; Kassé y col., 2016). Para ello realizaron entre otras técnicas, la detección de genes de virulencia de *E. coli* intestinales y ExPEC, pero ninguno de estos trabajos previos ha incluido en dicha caracterización a la resistencia a antimicrobianos.

Los agentes antimicrobianos, a menudo utilizados en el ganado, pertenecen a las mismas clases que aquellos administrados en tratamientos para humanos. Por lo tanto, la aplicación de antibióticos en sistemas de explotación pecuarios produce una presión selectiva que permite la selección y diseminación de bacterias resistentes, lo que representa un riesgo para la salud pública (Aarestrup, 2015). Varias investigaciones destacaron la aparición de resistencia a los antibióticos en aislamientos intestinales de *E. coli* nativas de los sistemas de producción animal (Kaesbohrer y col., 2012; Mazurek y col., 2013; Bok y col., 2015). Sin embargo, como se ha mencionado previamente, a la fecha no hemos encontrado estudios que aborden la resistencia a los antibióticos en *E. coli* nativa del TR de hembras bovinas. En este trabajo, la totalidad de los aislados de animales provenientes tanto de **Vs** como de **Vtr** fueron sensibles a amoxicilina-ácido clavulánico, ceftazidima y ceftiofur, lo que coincide con hallazgos informados por Malinowski y col. (2011) en cepas de *E. coli* aisladas de muestras de vacas con metritis/endometritis. La resistencia a tetraciclina fue significativa en *E. coli* de **Vtr**; siendo éste el antibiótico que se usa con mayor frecuencia para el tratamiento de diferentes tipos de infecciones en la hembra, tanto en establecimientos ganaderos como lecheros del NOA. A su vez, varios reportes europeos indican que cepas aisladas de explotaciones bovinas fueron resistentes a tetraciclina, estreptomicina, ampicilina y sulfametoxazol/trimetoprima (Gibbons y col., 2014; Hendriksen y col., 2008). En nuestros resultados, los aislados del TBR fueron, en su mayoría, sensibles a sulfametoxazol/trimetoprima (el 100% de los de **Vtr** y más del 95% de los de **Vs**). Es importante destacar que se obtuvo un mayor porcentaje de aislados multirresistentes en las muestras de **Vtr** que en las de **Vs**. Por lo tanto, es probable que una mayor

permanencia bajo protocolos de manejo, que normalmente utilizan antibióticos, haya seleccionado poblaciones con alguna resistencia en las microbiotas de las hembras.

En los intentos para definir los perfiles de *E. coli* con potencial patogénico en el TRB, Silva y col. (2009) evaluaron 15 FV en *E. coli* intrauterinas y no encontraron asociación entre ellos y dichas infecciones. En contraste, Sheldon y col. (2010) estudiaron 17 FV y solo encontraron asociación del gen *fyuA* con las afecciones uterinas postparto. En otro estudio, Bicalho y col. (2010) evaluaron 32 FV en aislamientos intrauterinos de *E. coli* y concluyeron que 6 de ellos (*fimH*, *hlyA*, *cdt*, *kpsMIII*, *ibeA* y *astA*) estaban asociados con enfermedad uterina postparto. Por su parte, Kassé y col. (2016) estudiaron 40 FV y solo *hra1* y *kpsMTIII* se asociaron con infecciones uterinas. Es probable que la disidencia en las conclusiones surja del hecho de que estos grupos de investigación no coincidieron en los FV estudiados. Además, si bien Kassé y col. (2016) incluyó en su estudio una mayor cantidad de genes, utilizó una metodología diferente, hibridación de sonda radioactiva, que los otros grupos. Otra posibilidad podría ser que la distribución de FV varíe entre rodeos y regiones (Silva y col., 2009; Bicalho y col., 2010; Sheldon y col., 2010; Kassé y col., 2016). El presente trabajo se basó en muestreos realizados en 5 tambos de la cuenca lechera de la zona de Trancas en Tucumán, por lo que los resultados de la caracterización de los factores de patogenicidad pueden diferir con los trabajos citados. En los 97 aislados estudiados se detectó una muy baja prevalencia de genes de *E. coli* diarreagénicos típicos; en coincidencia con los hallazgos obtenidos por Silva y col. (2009) a partir de aislados de útero bovino postparto. Estos resultados eran esperables ya que tanto las cepas comensales como las ExPEC presentan una baja o nula prevalencia de FV intestinales (Kaper y col. 2004).

En base a lo antes expuesto, se realizó el estudio de genes de virulencia de *E. coli* extraintestinales de mayor relevancia. Se evidenció la detección de 7 de los 11 genes de virulencia ensayados entre los aislados vaginales de *E. coli* bovinos.

El FV más prevalente en los aislados de los tres grupos de animales estudiados fue *fimH* (86,6%) en concordancia con lo reportado por Bicalho y col. (2010) y Kassé y col. (2016). Asimismo, Bicalho y col. (2010) indicaron que el gen *fimH* fue un importante

predictor de metritis y endometritis bovina. En cuanto al estudio de la expresión de la fimbria tipo 1, se observó una mayor prevalencia entre los aislados provenientes de vacas con enfermedad uterina (**Vmt**). Esto es particularmente interesante ya que se ha reportado que *E. coli* endometrial patogénica expresa el gen *fimH* y la adhesión a células endometriales depende de su expresión (Sheldon y col., 2010).

En el grupo **Vs** se detectó mayor prevalencia de aislados manosa resistente frente a la aglutinación con levaduras, lo que estaría indicando la expresión de alguna de las fimbrias manosa resistente, cuyo gen no evaluamos, como por ejemplo la fimbria G, fimbria M o M-aglutinina o la adhesina no fimbrial 1, y que podría estar asociada a la colonización del nicho vaginal.

Por otro lado, un solo aislado perteneciente al grupo **Vs** presentó hemoaglutinación positiva resistente a manosa pero no fue posible afirmar que dicho resultado se debe a la expresión de la fimbria P ya que no se detectó el gen *papC* por la técnica de PCR. Así la hemoaglutinación podría corresponder a la expresión de otra adhesina resistente a manosa cuyo gen no fue estudiado en la presente tesis como por ejemplo la fimbria G, fimbria M o M-aglutinina y la adhesina no fimbrial 1 (Johnson & Stell, 2000).

La capacidad de formación de biofilm contribuye a la patogenicidad de diversos microorganismos, y es considerado un paso importante en la patogénesis de infecciones por *E. coli* extra-intestinales (Jefferson, 2004; Nandanwara y col., 2014). En los resultados se evidenciaron que tanto la movilidad como la formación de biofilm, fueron significativamente mayores en las *E. coli* aisladas de vacas **Vmt**. La formación de biofilm también fue significativamente mayor en la población de aislados de **Vr** al compararlo con el grupo **Vs**.

Es conocido que la expresión de fimbria curly y la proteína producto del gen *agn43* tienen un papel clave en las etapas iniciales de la formación del biofilm de *E. coli* (Restieri y col., 2007). Por ello en este trabajo, además, evaluamos la presencia de los genes *agn43* y *csgA* (que codifica para la subunidad mayor de la fimbria curly) en las *E.*

coli del TRB, en los que se detectó una elevada prevalencia (41,2 y 35,1%, respectivamente) y además, una asociación positiva entre **Vr** y **Vmt** con *csgA*.

La matriz extracelular estabiliza al biofilm, y en el caso de *E. coli*, está compuesta principalmente por fimbria curly y celulosa (Hufnagel y col., 2015). De allí surge la relevancia de los resultados que destacan la asociación entre formación de biofilm y producción de fimbria curly/celulosa positivas con los grupos **Vmt** y **Vr**. Por el contrario, los aislados de **Vs** presentaron una menor capacidad de formación de biofilm y fimbria curly/celulosa y con movilidad reducida.

La subsistencia y formación de micro-colonias durante el progreso de la colonización que presupone una infección uterina requiere de la supervivencia de la bacteria frente a los mecanismos de defensa del hospedador (Jeon & Galvão, 2018), por lo que la resistencia a la acción bactericida del suero es un factor clave; por ello investigamos la presencia del gen *traT*, que codifica para una proteína que media tal resistencia. Sin embargo, a pesar de la prevalencia detectada (21,6%), no se observaron diferencias entre las poblaciones de *E. coli* de **Vs**, **Vmt** y **Vr**. Otros estudios, que evaluaron *E. coli* aisladas de útero, tampoco pudieron determinar asociación entre dicho gen y la enfermedad uterina en bovinos (Bicalho y col., 2010).

La prevalencia del gen *fyuA* detectada en **Vmt** está en concordancia con las observaciones previamente descritas por Sheldon y col. (2010), cuyos resultados evidenciaron que dicho gen se encontró en *E. coli* provenientes de vacas con metritis postparto pero no a partir del útero de animales clínicamente sanos. Teniendo en cuenta que el gen *fyuA* codifica la proteína de la membrana externa yersiniabactina que es importante para la captación de hierro y para el crecimiento del biofilm en UPEC (Hancock y col., 2008) deben realizarse estudios complementarios con un mayor número de animales deben realizarse para confirmar la relevancia de este FV en la patogenia de las afecciones uterinas postparto.

El gen *hlyA* codifica una hemolisina, la cual es expresada por una gran proporción de aislamientos ExPEC (Smith y col., 2007); por su parte, Silva y col (2009) reportaron su presencia en *E. coli* de útero bovino mientras que Bicalho y col. (2010)

observaron una asociación significativa entre la detección de dicho gen y la ocurrencia de metritis. Si bien en el presente estudio *hlyA* fue encontrado en aislados provenientes de **Vr** y **Vs**, en la caracterización fenotípica no se observó ningún aislado capaz de producir hemólisis.

La formación de estructuras capsulares promueve la supervivencia de las células bacterianas comprometidas en una infección; así el gen *kpsMT II* que codifica las proteínas capsulares K1 o K5 ha sido asociado a *E. coli* responsables de celulitis en pollos (de Brito y col., 2003), así como con ITU en mujeres (Moreno y col., 2005; Moreno y col., 2009). Tanto Kassé y col. (2016) como Bicalho y col. (2010) reportaron asociación entre dicho gen de virulencia y la incidencia de metritis postparto bovina. Sin embargo, un total de 5,2% de las hembras positivas a *E. coli* en este estudio fueron portadoras de bacterias con dicho gen, pero ninguna perteneció al grupo **Vmt** en concordancia con lo observado por Sheldon y col. (2010). Un resultado interesante fue la asociación observada entre dicho factor de virulencia y el grupo Vr en el análisis de componentes principales.

En base a los análisis y asociaciones encontradas, es posible que *E. coli* vaginales del filogrupo B1 y portadoras de los genes *fyuA* y *csgA* deban estudiarse para definir patrones de riesgo asociados a **Vmt** y **Vr**. Silva y col. (2009) describieron una asociación entre este filogrupo y ciertos genes de FV (*hlyE* y *hlyA*) en *E. coli* extra-intestinales causantes de infecciones endometriales bovinas. Sin embargo, en nuestros resultados *hlyA* se asoció a **Vs**.

Por otra parte, en el riesgo de enfermedad uterina debería tenerse en cuenta la portación conjunta de los genes *csgA*, *agn43* y *fyuA* y no solo al gen *fyuA*, como han sugerido Sheldon y col. (2010).

Los aislados de *E. coli* vaginales nativas portadoras del gen *kpsMTII* debería estudiarse por su potencial asociación con la etiología del SVR.

En cuanto al SVR, se ha informado que la presencia de un cuerpo luteo (CL) hipofuncional capaz de producir bajos niveles de progesterona y pico de LH asincrónico produce un entorno uterino inadecuado, aumentando las anomalías y las

pérdidas embrionarias (Pérez-Marín & España, 2007). Además, un nivel de progesterona suprabasal alrededor del estro ha sido descrito en vacas con SVR (Pérez-Marín & España, 2007). Esta disfunción hormonal se asocia con niveles bajos de gonadotropinas y regresión lútea incompleta después de la luteólisis, lo que prolonga el crecimiento folicular y daña el ovocito. Por lo general, aparece un intervalo estro/ovulación más prolongado que trae como consecuencia que la inseminación artificial se realice de manera prematura ya que el patrón de liberación de LH se modifica y el folículo no recibe el estímulo para que ocurra la ovulación. Además, el reclutamiento defectuoso del folículo durante las fases lútea media y tardía se ha sugerido como una causa de anovulación (Pérez-Marín & España, 2007). Asimismo, un ambiente hormonal anormal puede promover el desarrollo continuo del folículo dominante, afectando la función folicular y la calidad de los ovocitos, y por lo tanto reduciendo la fertilidad (Stock & Fortune, 1993).

Si bien a la fecha no hay un agente etiológico asociado a dicho síndrome, y teniendo en consideración que *E. coli* es capaz de alterar la función endócrina del TRB afectando la ovulación, así como la viabilidad del embrión y que animales con endometritis subclínica tuvieron concentraciones séricas intermedias de LPS entre 40 y 60 días después del parto (Williams y col., 2007; Sheldon y col., 2009; Magata y col., 2014), es probable que este microorganismo pueda participar en la patogenia del SVR por lo que deben realizarse estudios complementarios.

Ante todo lo expuesto, se puede afirmar que las *E. coli* presentes en vagina de vacas con enfermedad uterina posparto (**Vmt**) como así también en aquellas con síndrome de vaca repetidora de celo (**Vr**) expresan ciertos FV que les facilitarían la colonización del TRB. El control de la presencia de dichas cepas en las poblaciones de la microbiota vaginal disminuiría el riesgo que las mismas accedan a útero durante el posparto.

6. CONCLUSIONES PARCIALES

En base a estos resultados podemos concluir que:

- *Escherichia coli* es un integrante obligado de la microbiota vaginal en vacas adultas con trastorno reproductivos (enfermedad uterina posparto y síndrome de vaca repetidora); sin embargo, no siempre parece estar presente en vagina de vaquillonas sanas.
- Las poblaciones de *E. coli* vaginales en vaquillonas sanas son genéticamente más diversas que las de vacas con trastornos reproductivos (Vmt y Vr).
- Por primera vez se describe la conformación filogenética de las poblaciones de *E. coli* nativas vaginales bovinas, las que están constituidas por los filogrupos A, B1 y D, pero no por B2. La contribución del filogrupo B1 es mayor en la Vr respecto de las vaquillonas sanas o las Vmt.
- La microbiota vaginal bovina constituye un reservorio de *E. coli* que expresan resistencia antimicrobiana. Especialmente a Enrofloxacina, Ampicilina, Estreptomocina y Tetraciclina. Y las vacas con trastornos reproductivos se asocian a *E. coli* vaginales multirresistentes.
- La prevalencia baja o nula de factores genéticos de virulencia intestinales indica probablemente, una especificidad en el nicho, al menos para excluir las patógenas intestinales en las poblaciones de *E. coli* vaginales bovinas.
- La colonización vaginal por *E. coli* del filogrupo B1, portadora de los genes *fyuA*, *csgA* y *ykpsMTII*, productora de biofilm y que exprese fimbria curly/celulosa constituiría un factor de riesgo para el desarrollo del Síndrome de vaca repetidora.
- Las poblaciones de *E. coli* vaginales de riesgo de producir enfermedad uterina posparto responden total o parcialmente al perfil: portación de los genes *fyuA*, *csgA*, *agn43*, así como la expresión de: movilidad, producción de curly/celulosa y formación de biofilm.



CAPÍTULO 3

**SELECCIÓN DE EXTRACTOS DE ORIGEN VEGETAL CON
ACTIVIDAD INHIBITORIA SOBRE *Escherichia coli*
PATOGENICAS NATIVAS DEL TRACTO REPRODUCTOR
BOVINO (TRB).**

Méd. Vet. Candelaria Gonzalez Moreno

1. INTRODUCCIÓN

El tratamiento de la metritis postparto usualmente incluye el uso de antibióticos, antisépticos, hormonas y agentes antiinflamatorios (Malinowski y col., 2011; Haimerl & Heuwieser, 2014; Newby y col., 2017; Jeon y col., 2018). Muchas de estas sustancias se administran parenteralmente o se aplican directamente en el lumen uterino con el objetivo de eliminar bacterias, incrementar los mecanismos de defensa del tracto o aumentar el tono y el flujo sanguíneo del útero (Palmer, 2007; Haimerl & Heuwieser, 2014). Así, en el tratamiento de las metritis es habitual el uso indiscriminado de antimicrobianos de amplio espectro, sin conocer previamente su eficacia (Haimerl & Heuwieser, 2014). Además, cuando las sustancias antimicrobianas se administran localmente en el útero no se tiene la certeza que las mismas se distribuyan uniformemente en las capas del órgano (Chenault y col., 2004; Sheldon y col., 2004b). La aplicación indiscriminada produce la alteración de la microbiota normal, disminución de la capacidad reproductiva y de la actividad fagocítica de los polimorfonucleares (PMN) uterinos (Jeon y col., 2014, 2018; Mandhwani y col., 2017). Otros inconvenientes de estas terapias están relacionados con los períodos de carencia para disponer la utilización de la carne y el descarte de la leche con residuos antibióticos (Landers y col., 2012; Mandhwani y col., 2017).

Los efectos indeseables que surgen de la aplicación de las terapias antimicrobiana en los sistemas de cría intensiva están asociados a la aparición de cepas bacterianas altamente resistentes, como resultado del uso continuo e indiscriminado de antimicrobianos (Landers y col., 2012; Mandhwani y col., 2017; Jeon y col., 2018). Existen evidencias microbiológicas y clínicas que indican que las bacterias resistentes o los determinantes de resistencia puedan generar problemas terapéuticos en el hombre (Machado y col., 2014). Así, la resistencia a los antibióticos se ha convertido en uno de los problemas de salud pública más graves a nivel mundial, haciendo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) lo haya calificado como “amenaza global” (WHO Global Action Plan on Antimicrobial Resistance, 2015). Los países miembros de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), de la cual Argentina forma parte,

establecieron entre sus prioridades mejorar la seguridad de los alimentos de origen animal y el bienestar animal usando bases científicas. Finalmente, la Unión Europea, considerando que no se debe incrementar el reservorio de bacterias resistentes en los animales de producción, a través de acciones de su Consejo de Ministros de Agricultura de la UE-15 y en el marco de una nueva política de seguridad alimentaria y de la creación de la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), aprobó las directivas para la regulación del empleo de aditivos en alimentación animal y la prohibición del uso de antibióticos como promotores del crecimiento en sistemas de cría intensivos.

Por lo mencionado anteriormente, es de especial interés la búsqueda de alternativas sustentables diferentes a antibióticos, para la prevención y tratamiento de infecciones que son clave en el proceso productivo y que exigen, casi de rutina, la aplicación de protocolos con antimicrobianos (Mandhwani y col., 2017). Se han realizado diversos estudios con el objetivo de resolver o prevenir los cuadros infecciosos que se presentan en el ganado bovino buscando alternativas en recursos que presenten menos efectos indeseables, como sustancias o agentes inmunomoduladores, sustancias o extractos naturales con propiedades terapéuticas, así como la suplementación con microorganismos benéficos para mantener el equilibrio de la microbiota que coloniza las mucosas del animal (Gonzalez Moreno & Otero, 2015; Genis y col., 2017; Mandhwani y col., 2017).

El empleo de productos naturales en la salud animal es considerado actualmente una fuente de recursos terapéuticos menos agresivos para el medio ambiente, los animales y el hombre (Sánchez, 2004; Mandhwani y col., 2017). En el área de veterinaria, particularmente en sanidad bovina, se ha propuesto la utilización de formulaciones con extractos naturales que exhiben propiedades antisépticas, desinfectantes, antioxidantes o antiinflamatorias; por ejemplo, Sarkar y col. (2006) evaluaron la eficacia del extracto de ajo y la prostaglandina-F₂-α en el tratamiento de la endometritis en vacas. Más recientemente, Galarza Álvarez (2013) evaluó la acción inhibitoria del extracto etanólico del propóleo frente a patógenos responsables de mastitis y metritis puerperal bovina. Además, Kumar

y col. (2013) informaron que los extractos hidroalcohólicos e hidroacetónicos de *Azadirachta indica* tienen un potente efecto inmunomodulador y terapéutico en vacas con SVR.

Los productos vegetales poseen la ventaja de ser generalmente inocuos y eficaces, por lo que gozan de amplio reconocimiento y aceptación. En la década de los '90 ocurrió un incremento notable en el uso de plantas medicinales, basado tanto en la eficacia terapéutica como en las ventajas económicas. Así la fitoterapia es objeto de atención tanto en Medicina Veterinaria como en Salud Pública. En nuestro país, a través del plan Argentina 2020, el desarrollo de fitofármacos en nuestra región (Tucumán) se ha designado como una temática prioritaria. Así, las sustancias naturales aplicadas en la mucosa del TRB pueden ejercer su efecto en la microbiota autóctona (efecto prebiótico) o en el epitelio que reviste el tracto (efecto antiinflamatorio, cicatrizante, re-epitelializante y/o antioxidante).

A la fecha no existe una reglamentación y/o estandarización en la metodología para la evaluación del efecto inhibitorio de extractos vegetales, como se establece para antibióticos. Así, la mayoría de las publicaciones existentes se basan en los métodos utilizados para evaluar la sensibilidad frente a antibióticos. Las técnicas más frecuentemente aplicadas debido a su rapidez y simplicidad son: la técnica de difusión en agar y los métodos de dilución en medio de cultivo líquido y en agar (Hammer y col., 1999; Mahboubi y col., 2006; Malik & Singh, 2010).

Se ha informado la actividad antimicrobiana y antioxidante de extractos acuosos y etanólicos de *Aloe barberensis miller* (Abdul Qadir y col., 2017) así como de *Aloysia triphylla* (Ali y col., 2011). De esta manera, el efecto bactericida de *Aloe barberensis miller* fue reportado contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Bacillus subtilis* y *Pierurella multocida*. Ali y col. (2011) por su parte observaron que el aceite esencial de *Aloysia triphylla* exhibió actividad antibacteriana contra *B. subtilis* y *S. aureus*. Además, Duarte y col. (2007) reportaron que *A. triphylla* posee actividad bactericida sobre *E. coli*. Otros autores informaron que extractos de *Salvia officinalis* presentan actividad anti-inflamatoria, antioxidante y antimicrobiana (Tardugno, 2018; Ghorbani & Esmailizadeh, 2017). Así, el aceite

esencial y el extracto etanólico de *S. officinalis* muestran fuertes efectos bactericidas y bacteriostáticos contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Entre las Gram-negativas, el aceite esencial de *S. officinalis* tiene un importante efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *E. coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Kb. pneumoniae*, *Pseudomonas morgani*, *Salmonella anatum*, *S. enteritidis*, *S. typhi*, y *Shigella sonnei*, mientras que un efecto similar fue reportado para el extracto etanólico en *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. enteritidis* (Ghorbani & Esmailzadeh, 2017). Se ha puesto en evidencia el efecto antiinflamatorio y cicatrizante de *Gentiana lutea* (Mathew y col., 2004) así como su actividad antibacteriana frente a *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *P. aeruginosa*, *P. tolaasii* y *Enterobacter cloacae* (Šavikin y col., 2009; Mirzaee y col. 2017). Además, la actividad tanto antiviral como antimicrobiana potente y selectiva de extractos acuosos y etanólicos de *Echinacea purpura* fue descrita por Hudson, (2012), quien además demostró que dichos extractos presentan múltiples actividades inmuno-moduladoras, que comprenden la estimulación de ciertas funciones inmunes tales como la actividad fagocítica de macrófagos y la supresión de las respuestas proinflamatorias de las células epiteliales frente a virus y bacterias, que se manifiesta como alteraciones en la secreción de varias citoquinas y quimiocinas. En concordancia, Hacioglu y col., (2017) analizaron la actividad antimicrobiana de infusiones de dicho extracto, solas o en combinación con antibióticos. También se ha postulado el uso de extractos acuosos y etanólicos de *Calendula officinalis* con acción antimicrobiana sobre aislados bacterianos clínicos (Efstratiou y col., 2012) y sobre patógenos atípicos de rumiantes tales como *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (Arjoon y col., 2012) y la inhibición de la actividad de la colagenasa bacteriana fue reportada en estudios *in vitro* con aislados de *Clostridium histolyticum*. (Nicolaus y col., 2017). Se ha demostrado que los extractos de *Panax ginseng* tienen tanto acciones bacteriostáticas como bactericidas y parecen ejercer sus efectos por varios mecanismos: alteración de la formación de biofilm, inhibición de factores de virulencia, alteración en detección del *quorum-sensing* e inhibición de la motilidad. Además, poseen propiedades inmuno-moduladoras implicadas en la mejora de las infecciones (Kachur & Suntres, 2015) y previenen infecciones

herpéticas en vagina humana (Cho y col., 2013). El efecto de extractos vegetales sobre microorganismos multirresistentes abre posibilidades de aplicación muy prometedoras; así la actividad de *Allium sativa* frente a cepas multirresistentes de *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., y *P. aeruginosa* fue descrita por Karuppiah & Rajaram (2012). En concordancia, Awan y col. (2017) reportaron un fuerte efecto antibacteriano de dicho extracto vegetal, en comparación con los antibióticos estándar recomendados contra siete aislamientos bacterianos clínicos como *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Kb. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes* y *Serratia marcescens*. Además, se ha demostrado que estos extractos pueden ejercer acción antioxidante en ratones hepatotóxicos inducidos por paracetamol (Ozougwu & Eyo, (2014).

Menos estudiado es el extracto de *Ruscus aesculeatus*, el cual posee propiedades antiinflamatorias al inhibir los efectos del factor de necrosis tumoral α y la activación del factor nuclear κ B (Huang y col., 2008). Se ha evidenciado propiedades antioxidantes y una alta actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Matricaria chamomilla* L frente a *Listeria monocytogenes* y *S. aureus* (Stanojevic y col., 2016). Los efectos antioxidantes y antimicrobianos de extractos de *Malva sylvestris* han sido descritos sobre bacterias Gram-positivas (*Bacillus cereus*, *S. aureus*), Gram-negativas (*E. coli*, *Salmonella* sp., *Proteus vulgaris*), hongos filamentosos (*Aspergillus niger*, *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp.) y levaduriformes (*Saccharomyces cerevisiae*) (Popova y col., 2014).

En base a estos antecedentes y a los resultados obtenidos en las primeras etapas de este trabajo de tesis, se puede hipotetizar que extractos de origen vegetal podrían ser activos frente a *E. coli* con potencial patogénico y de esta manera controlar la colonización vaginal de estas cepas mejorando así la sanidad del TRB.

2. OBJETIVO ESPECÍFICO

Evaluar la sensibilidad de las *E. coli* con mayor potencial patogénico y perfil de resistencia antimicrobiana frente a extractos de origen vegetal, para avanzar en el diseño de estrategias veterinarias sustentables para la prevención y control de trastornos reproductivos asociados a este patógeno.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Escherichia coli* POTENCIALMENTE PATOGENICAS DE EXTRACTOS VEGETALES

A fin de determinar si los extractos de las plantas medicinales ensayadas poseen un efecto bacteriostático o bactericida sobre los aislados de *E. coli* asociadas a trastornos reproductivos en bovinos, se realizó el relevamiento de la actividad inhibitoria de los 11 extractos estandarizados que se indican en la **Tabla 1** utilizando el método de micro dilución en caldo descripta en las normas del CLSI (2012) para soluciones hidroalcohólicas.

3.1.1. EXTRACTOS VEGETALES

Para el desarrollo de esta etapa se trabajó con 11 extractos de origen vegetal, elegidos en base a su potencial antimicrobiano, antiinflamatorio y/o antioxidante (según se describió en la **sección 1** del presente capítulo). Se utilizaron soluciones hidroalcohólicas de extractos estandarizados adquiridos del Laboratorio Basel (Argentina). En la **Tabla 1** se presenta información detallada de cada extracto.

Tabla 1. Extractos vegetales ensayados

EV	Nombre científico	Nombre común	Parte utilizada	Principio activo*
EP	<i>Echinacea purpurea</i>	Echinacea	Raíces	Echinacosidos
SO	<i>Salvia officinalis</i>	Salvia	Sumidades floridas	Ácido ursórico
MS	<i>Malva sylvestris</i>	Malva	Hojas	Flavonoides
PG	<i>Panax ginseng</i>	Ginseng	Raíces	Ginsenósidos
GL	<i>Genciana lutea</i>	Genciana	Raíces	Ác. orgánicos
AS	<i>Allium sativum</i>	Ajo	Bulbos	Aliina
ABm	<i>Aloe barberensis miller</i>	Aloe Vera	Resinas	Saponinas
CO	<i>Calendula officinalis</i>	Caléndula	Inflorescencias	Flavonoides- Aceites esenciales
RA	<i>Ruscus aesculeatus</i>	Ruscus	Rizomas	Ruscogeninas
McL	<i>Matricaria chamomilla L</i>	Manzanilla	Inflorescencias	Flavonoides
AT	<i>Aloysia triphylla</i>	Aloysia	Hojas	Aceites esenciales

* Determinado por TLC, EC y/o CG (Cromatografía en capa fina, electroforesis capilar, cromatografía gaseosa, respectivamente).

3.1.2. ESPECIFICACIONES DE CALIDAD DE LOS EXTRACTOS VEGETALES UTILIZADOS

- Solución madre: 100 mg mL⁻¹ extracto seco en hidroalcohol (60:40) (Droga/extracto: 10:1; pH: 4-8; cenizas <5%; δ: 0,990 -0,997 g mL⁻¹).
- Producidos bajo normas de calidad establecidas por Farmacopea Europea (Laboratorio Basel, Argentina).
- Análisis microbiológico (*E. coli*, *Salmonella sp.*, *S. aureus*, *Pseudomona sp.*): negativo.
- Análisis de solventes residuales (As, Pb, Hg, SO₄⁼ y pesticidas): negativo.

3.1.3. MICROORGANISMOS

En esta etapa, se utilizaron 8 *E. coli* con perfil de virulencia asociado a Vtr (caracterizados en el Capítulo 2). Los aislados se seleccionaron según: **a-** su origen (vacas con enfermedad uterina (**Vmt**) o con SVR (**Vr**)); **b-** capacidad de expresar 2 o más de los factores de patogenicidad y **c-** presencia de al menos uno de los genes asociados a virulencia (**Tabla 2**).

Tabla 2. *E. coli* con mayor potencial patogénico (perfil de virulencia asociado a Vtr).

Aisla -do*	Origen	Filo-grupo	Movilidad	Biofilm	Fimbria curly/celulosa	Fimbria P	Pili tipo 1	csg A	Fim H	Agn 43	fyu A
2003	Vr	B1	Baja	Alta	+	-	+	+	+	+	+
2014	Vr	B1	Alta	Media	+	-	-	+	-	-	-
2016	Vr	A	Media	Alta	+	-	+	-	+	-	-
2018	Vr	B1	Alta	Media	+	-	+	+	+	-	-
2021	Vr	A	Alta	Baja	+	-	-	-	+	+	-
2051	Vr	B1	Alta	Media	+	-	+	-	+	-	-
3001	Vmt	A	Alta	Baja	+	-	+	-	+	+	+
3006	Vmt	A	Alta	Media	+	-	+	+	+	-	+

*Los aislados fueron incluidos a la Colección del Laboratorio de Ecología Microbiana y Sanidad Animal (LEMSA) de INSIBIO (UNT-CONICET).

Para control de calidad se incluyó en los ensayos a *E. coli* EDL933, una cepa de referencia (EHEC), de patogenicidad y resistencia conocidas y proveniente de otro nicho.

3.1.4. CONDICIONES DE CRECIMIENTO Y CONSERVACION

A partir de los cultivos conservados de aislados de *E. coli* y de la cepa patrón, se tomaron alícuotas de 10 µL que se activaron en placas de agar LB y se incubaron durante 18 hs a 37 °C.

3.1.5. PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO

A partir de la solución madre (100 mg mL⁻¹ de extracto seco en solución hidroalcohólica 60:40) se practicaron diluciones sucesivas en caldo Mueller

Hinton (MH) (ver anexo) para obtener diluciones desde 1/2 hasta 1/512 como indica la **Figura 1**.

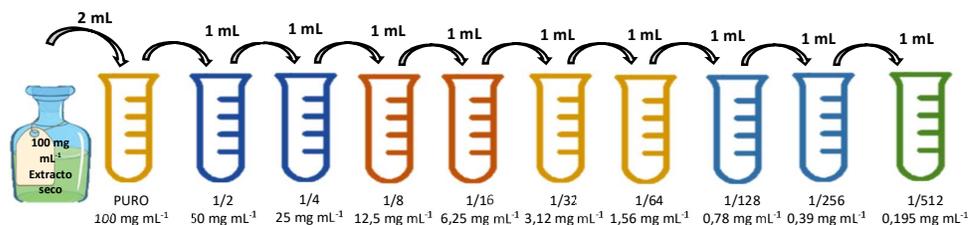


Figura 1. Esquema de diluciones de extracto obtenidas en caldo MH a partir de la solución madre (100 mg mL⁻¹).

3.1.6. ESTANDARIZACIÓN DEL INÓCULO BACTERIANO

A partir de un cultivo activo de cada microorganismo se cosecharon las células, se lavaron (2 veces) con solución fisiológica (SF) estéril y se re-suspendieron ajustando la turbidez a la equivalente del 0,5 de la escala de Mc Farland ($\sim 1,2 \times 10^8$ UFC mL⁻¹). Seguidamente, en caldo MH se realizó una dilución 1/1000 del inóculo de turbidez ajustada, de manera tal que la concentración bacteriana fue de $\sim 10^6$ UFC mL⁻¹.

3.1.7. SIEMBRA, CONDICIONES DE INCUBACIÓN Y LECTURA

En cada pocillo de las microplacas de poliestireno, se sembraron: 100 μ L de caldo MH, 80 μ L de la solución extracto de trabajo correspondiente y 20 μ L de la suspensión 10^6 UFC mL⁻¹ del microorganismo (concentración final en el pocillo de $\sim 10^5$ UFC mL⁻¹). La lectura se realizó por evaluación visual de turbidez, según se establece en la norma (CLSI) luego de una incubación de 18-20 hs a 37 °C. Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM), definida como la mínima concentración de la sustancia que inhibe totalmente el desarrollo del microorganismo estudiado.

Asimismo, en los pocillos en que se observó inhibición del crecimiento (concentración inmediatamente superior a la CIM) se determinó el número de células viables (UFC mL⁻¹) por el método de diluciones sucesivas y posterior cultivo en placas de agar Mc Conkey. esto permitió determinar si el extracto ejercía efecto bacteriostático o bactericida (**Figura 2**).

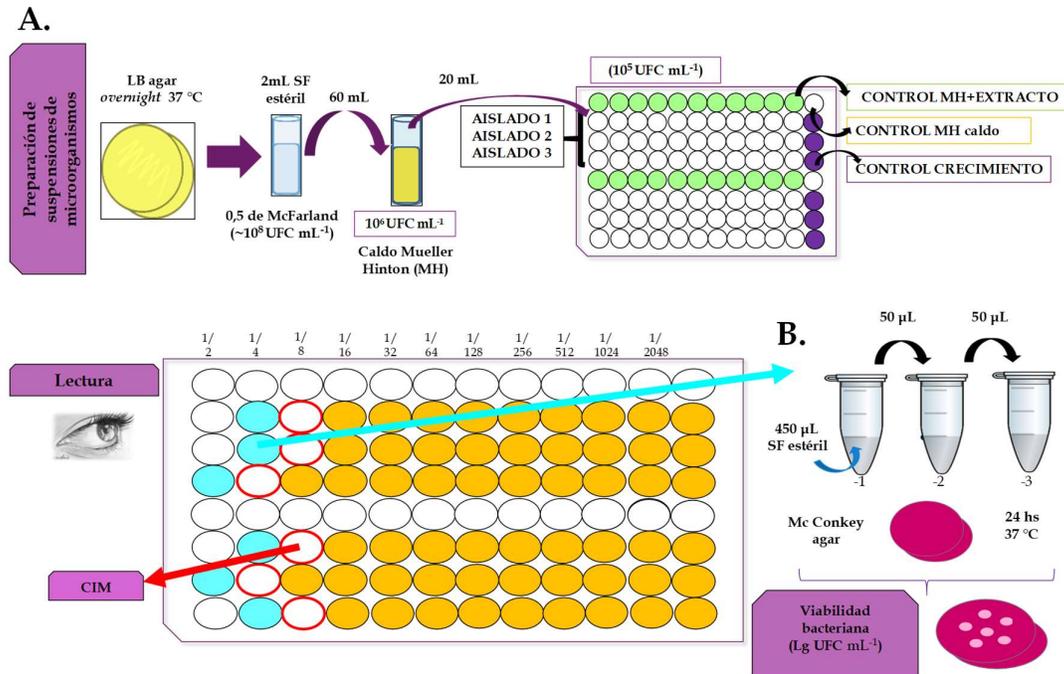


Figura 2. Determinación de efecto inhibitorio de los extractos vegetales sobre *E. coli* asociada a trastornos reproductivos en vacas de tambo: **A.** bacteriostático (CIM): Método de micro-dilución en caldo, **B.** bactericida: determinación de viabilidad en la concentración inmediatamente superior a la CIM (modificado de CLSI, 2012).

En el esquema de siembra de las microplacas se incluyeron 3 controles:

- a- **de esterilidad** de los medios preparados, utilizando 200 µL de caldo MH del mismo lote cargado en la microplaca (pocillo no inoculado en el momento del ensayo).
- b- **de crecimiento bacteriano**, 180 µL de caldo MH del mismo lote fue inoculado con 20 µL de la suspensión bacteriana.
- c- **de diluciones de extractos** preparadas en cada ensayo, en este caso, cada pocillo se cargó con 100 µL de extracto y 100 µL de caldo MH.

3.2. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE *Escherichia coli* CON POTENCIAL PATOGENICO A ANTIBIOTICOS EN PRESENCIA DE EXTRACTOS VEGETALES

En esta etapa, se evaluó la sensibilidad a antibióticos (se eligieron aquellos de uso corriente en medicina veterinaria) en presencia de extractos vegetales de

aislados de *E. coli* resistentes. En este relevamiento se aplicó una modificación de la técnica de difusión en disco en placas de agar, previamente descripta por Moussaoui & Tajelmolk (2016).

3.2.1. EXTRACTOS VEGETALES, ANTIBIÓTICOS Y MICROORGANISMOS EVALUADOS

En base a la actividad bacteriostática y bactericida observadas en la primera etapa, se seleccionaron los extractos hidroalcohólicos de:

-**McL**: *Matricaria chamomilla* L

-**AT**: *Aloysia triphylla*

-**SO**: *Salvia officinalis*

-**GL**: *Genciana lutea*

Se seleccionaron aquellos antibióticos para los cuales los aislados de *E. coli* más patogénicos mostraron resistencia en la caracterización realizada en etapas anteriores (**Capítulo 2**): Amoxicilina-ácido clavulánico, Estreptomina, Tetraciclina y Enrofloxacin. Cabe destacar que en esta etapa se trabajó con Ciprofloxacina (CPX) por ser un metabolito de Enrofloxacin (ENR), ya que este último no estuvo disponible comercialmente en nuestro medio.

Los microorganismos con los que se trabajó en este ensayo incluyeron a 3 de las *E. coli* con perfil patogénico (**Tabla 2**) que se mostraron resistentes a alguno de los antibióticos evaluados previamente; y 2 aislados que fueron sensibles en todas las pruebas realizadas (**Tabla 3**).

Tabla 3. Perfil de sensibilidad de las *E. coli* ensayadas. (Difusión en disco).

Agente antimicrobiano	<i>E. coli</i>				
	LEMSA 2003	LEMSA 2014	LEMSA 2016	LEMSA 2018	LEMSA 2021
Ampicilina (10 µg)	S	S	S	S	S
Amoxicilina-ácido clavulánico (30 µg)	S	S	S	S	R
Ceftazidima (30 µg)	S	S	S	S	S
Ceftiofur (30 µg)	S	S	S	S	S
Estreptomina (25 µg)	S	S	S	S	R
Tetraciclina (30 µg)	S	R	S	S	R
Enrofloxacin (5 µg)	S	S	R	S	S
Sulfametoxazol/trimetoprima (25 µg)	S	S	S	S	S

Clasificación de los aislados como sensible (S) y resistente (**R**), en base a los resultados obtenidos comparados con los puntos de corte para enterobacterias (CLSI, 2012).

3.2.2. CONDICIONES DE CRECIMIENTO

En todos los ensayos se utilizaron cultivos activos de los microorganismos, desarrollados en los medios y condiciones como se detalla: 10µL de los cultivos conservados en BHI-glicerol (-20 °C) se inocularon en placas de LB agar y se incubaron por 18-24 hs a 37 °C (**Figura 3**).

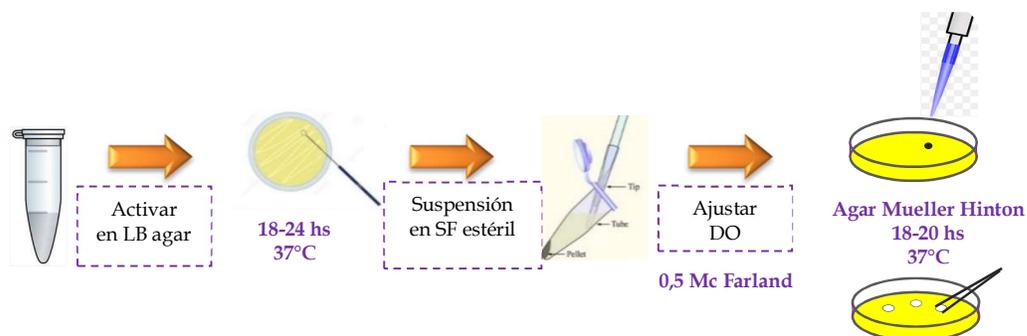


Figura 3. Técnica de difusión en disco de acuerdo con las recomendaciones del CLSI (2012) modificado para la determinación de la actividad antimicrobiana de extractos vegetales estandarizados y antibióticos.

3.2.3. SIEMBRA, CONDICIONES DE INCUBACIÓN Y LECTURA

La estandarización de las suspensiones bacterianas se realizó según lo descrito previamente (**ítem 3.1.6.**); a continuación, las mismas (0,5 de la escala de M

c Farland) fueron sembradas con hisopo estéril en placas de agar MH, se las dejó reposar unos minutos. Luego se colocaron los discos de antibióticos y los extractos vegetales, los cuales se evaluaron de dos formas: en discos cargados con 15 μ L de solución hidroalcohólica (1,5 mg de extracto seco) o con la misma cantidad de extracto sembrado en un punto sobre la placa (*spot*). Como control negativo se utilizó un disco cargado con 15 μ L de una solución de etanol absoluto y agua destilada estéril (60:40). Las placas se incubaron a 37 °C en condiciones de aerobiosis durante 18 hs. Cumplido el tiempo de incubación, se observaron los halos de inhibición alrededor de los discos de antibióticos, se midieron sus diámetros (expresados en mm) y se compararon con los puntos de corte para cada antibiótico (CLSI, 2012).

3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los ensayos se realizaron por duplicado y fueron evaluados estadísticamente mediante el análisis de la varianza y un *post test* (Prueba de Fisher, con $\alpha=0,05$) para comparaciones múltiples, en aquellos casos en que los efectos o sus interacciones fueron significativos. Para ello se emplearon dos *softwares*: Minitab 15 e Infostat versión estudiantil. Cuando la aplicación de ANOVA, en el análisis de residuos y determinación de efectos, no evidenció una distribución normal, se aplicó un análisis no paramétrico de la varianza (Prueba de Kruskal Wallis).

4. RESULTADOS

4.1. EFECTO DE EXTRACTOS VEGETALES ESTANDARIZADOS SOBRE *Escherichia coli* CON POTENCIAL PATOGENICO

Los valores de CIM de los extractos vegetales sobre *E. coli* del TRB, obtenidos por el método de micro-dilución en caldo, indican que no existe un único patrón de comportamiento (Tabla 4).

De las *E. coli* autóctonas del TRB, solo LEMSA 2051 fue resistente al efecto de los 11 extractos ensayados, exhibiendo valores de CIM=25 mg mL⁻¹; el mismo comportamiento mostró la cepa de referencia EDL 933.

Tabla 4. Mapa de calor de la sensibilidad (CIM)* de los aislados de *E. coli* frente a los extractos vegetales.

	LEMSA 2003	LEMSA 2014	LEMSA 2016	LEMSA 2018	LEMSA 2021	LEMSA 2051	LEMSA 3001	LEMSA 3006	EDL 933
ABm (<i>Aloe barberensis m</i>)	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	25	25	6,25	25
MS (<i>Malva sylvestris</i>)	12,5	25	12,5	12,5	12,5	25	25	12,5	25
SO (<i>Salvia officinalis</i>)	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	25	12,5	6,25	25
GL (<i>Genciana lutea</i>)	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	25	12,5	25	25
EP (<i>Echinacea purpura</i>)	25	25	12,5	12,5	12,5	25	25	12,5	25
CO (<i>Calendula officinalis</i>)	25	25	12,5	12,5	12,5	25	25	12,5	25
PG (<i>Panax ginseng</i>)	25	25	12,5	6,25	12,5	25	25	12,5	25
AS (<i>Allium sativum</i>)	25	25	12,5	12,5	12,5	25	25	12,5	25
RA (<i>Ruscus aesculeatus</i>)	25	25	12,5	12,5	12,5	25	25	12,5	25
McL (<i>Matricaria chamomilla L</i>)	25	12,5	6,25	6,25	12,5	25	12,5	12,5	25
AT (<i>Aloysia triphylla</i>)	25	25	12,5	12,5	12,5	25	25	25	25

*Expresada en mg mL⁻¹.

El resto de los aislados de *E. coli* del TRB mostraron sensibilidad variable frente al menos de uno de los extractos (CIM≤12,5 mg mL⁻¹); siendo los aislados más sensibles *E. coli* LEMSA 2018, 2016 y 3006, que presentan valores de CIM de 6,25 mg mL⁻¹ para algunos de los extractos mientras que LEMSA 2003, 2014, 2021 y 3001 presentaron sensibilidad intermedia (CIM=25 o 12,5 mg mL⁻¹).

Para evaluar cual/cuales de los extractos tuvieron la mejor actividad inhibitoria frente a las *E. coli* del TRB, se aplicó un análisis de correspondencias entre los valores de CIM de cada extracto y cada aislado (**Figura 4**). El mismo indicó que la mayor capacidad inhibitoria (CIM=12,5 o 6,25 mg mL⁻¹) fue expresada por los extractos de *Matricaria chamomilla* L (McL) y *Salvia officinalis* (SO), seguidos por *Aloe barberensis miller* (ABm), *Genciana lutea* (GL) y *Malva sylvestris* (MS). Además, la capacidad inhibitoria de AS *Allium sativum*, PG *Panax ginseng*, AT *Aloysia triphylla*, RA *Ruscus aesculeatus*, EP *Echinacea purpura* y CO *Calendula officinalis* fue reducida.

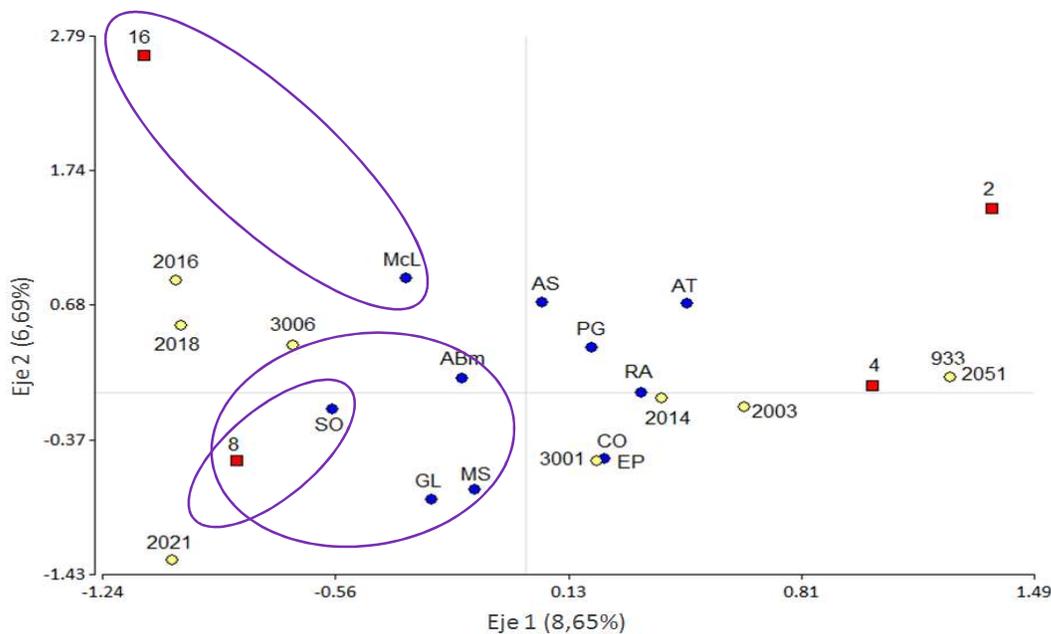


Figura 4. Análisis de correspondencia de la actividad inhibitoria (CIM) de 11 extractos vegetales sobre las *E. coli* del TRB con mayor potencial patogénico. Se indican los valores de las diluciones de los extractos (2=50, 4=25, 8=12,5; 16= 6,25 mg mL⁻¹ de extracto seco). Se indica entre paréntesis la contribución a chi cuadrado. La nomenclatura de los extractos corresponde a la indicada en la **Tabla 1**.

La actividad bactericida se determinó mediante el cálculo del número de células viables (UFC mL⁻¹) en los pocillos con concentraciones de extracto superiores a la CIM. Después de 20 hs de contacto con cada extracto se determinó la viabilidad de *E. coli*. Los valores de viabilidad determinados en cada extracto se sometieron a un análisis de correspondencia y se observó que la

mejor actividad bactericida fue por acción de *Matricaria chamomilla* L (McL) y *Ruscus aesculeatus* (RA), como lo indica el biplot de la **Figura 5**.

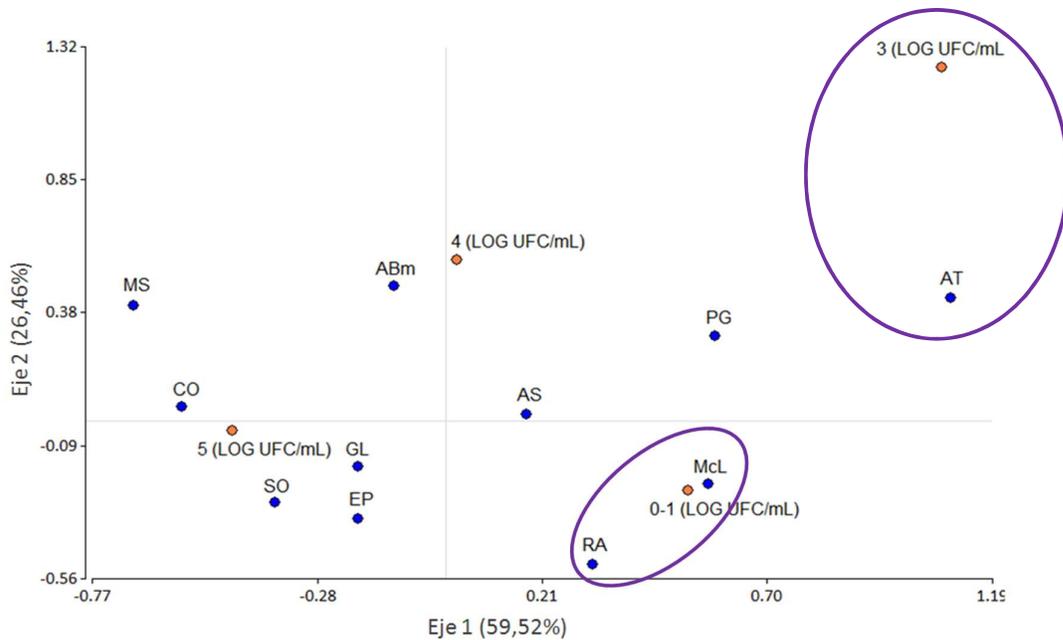


Figura 5. Análisis de correspondencia de la distribución de los valores de viabilidad de las *E. coli* (UFC mL⁻¹) obtenidos en presencia de los extractos vegetales (concentraciones > CIM). Se indica entre paréntesis la contribución a chi cuadrado.

El análisis estadístico evidenció diferencias significativas en los valores de viabilidad obtenidos para cada microorganismo crecido en concentraciones mayores a la CIM de cada extracto, evidenciando comportamientos diferentes según el aislado (**Figura 6**). Así, *E. coli* LEMSA 2014 y 2016 fueron significativamente más sensibles y *E. coli* LEMSA 2051 y 3006 fueron tan resistentes como la cepa de referencia *E. coli* 933 (EHEC), mientras que, en el resto de los aislados estudiados (*E. coli* LEMSA 2003, 2018, 2021 y 3001) no se observaron diferencias significativas en la sensibilidad, medida como la viabilidad media frente a extractos.

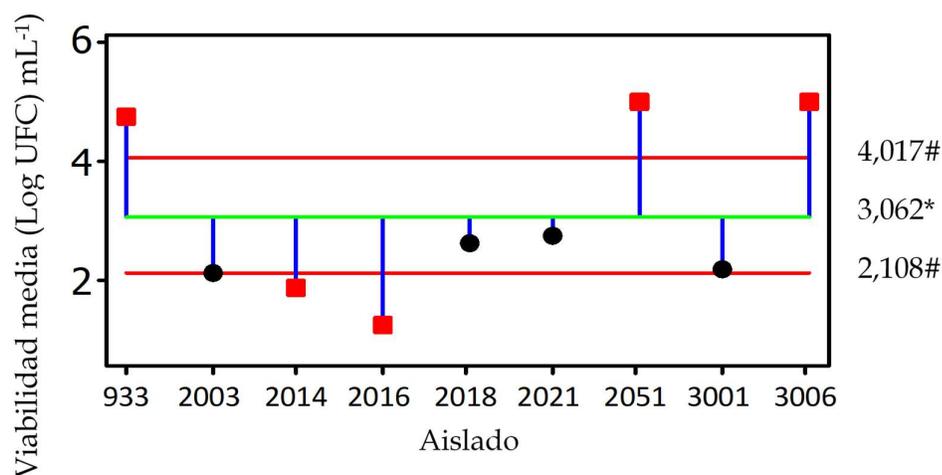


Figura 6. Viabilidad media de cada *E. coli* en presencia de los extractos en concentraciones > CIM. *Media general, #Límites de decisión.

4.2. SENSIBILIDAD DE *Escherichia coli* CON POTENCIAL PATOGENICO A ANTIBIOTICOS EN PRESENCIA DE EXTRACTOS VEGETALES

Los resultados indicaron que *E. coli* vaginales incrementan su sensibilidad a antibióticos en presencia de los extractos cuando los discos con extracto o su siembra en *spots*, se ubican cercanos al disco del antibiótico, permitiendo evidenciar halos de inhibición (**Figura 7**). En general, el efecto se evidenció mejor cuando los extractos se inocularon en *spots* en las placas de agar MH.

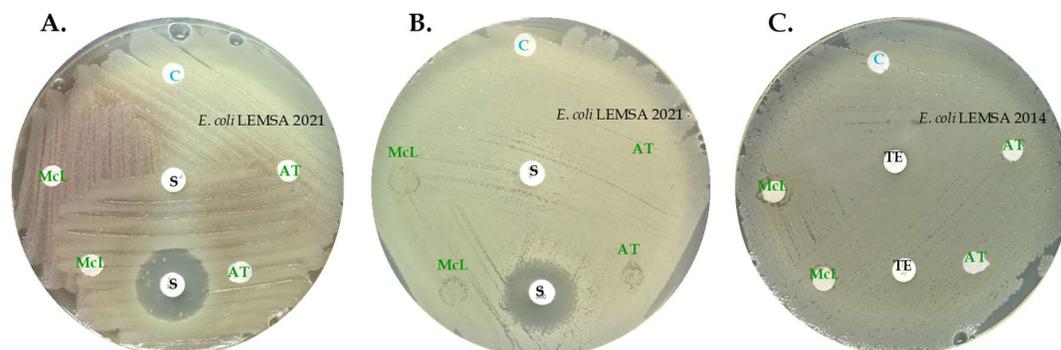


Figura 7. A. Efecto inhibitorio de estreptomicina (S) y tetraciclina (TE) en presencia de los extractos de *Matricaria chamomilla* L (McL) y *Aloysia triphylla* (AT). c: control del diluyente (solución hidroalcohólica, 60:40). Extractos impregnados en disco (**A, C**) y sembrados en *spots* (**B**).

En la **Tabla 5** se presentan los resultados de la sensibilidad de las *E. coli* a los antibióticos en presencia de extractos vegetales. Los dos microorganismos resistentes a tetraciclina, *E. coli* LEMSA 2014 y LEMSA 2021, no mostraron cambios en su resistencia frente a dicho antibiótico en presencia de los extractos ensayados (**Figura 7C, Tabla 5**). En contraposición, los cuatro extractos aumentaron la sensibilidad a ciprofloxacina y estreptomycinina de los aislados LEMSA 2016 y 2021 (**Figura 7A y 7B, Tabla 5**), respectivamente. El efecto de la ciprofloxacina en presencia de los extractos sobre LEMSA 2016 se visualizó mejor cuando los extractos se ensayaron en *spots* (**Tabla 5**). Un efecto similar se observó sobre LEMSA 2014; si bien dicho aislado es sensible a ciprofloxacina, los halos de inhibición obtenidos frente al antibiótico fueron mayores en presencia de los extractos (datos no incluidos en tabla). Los extractos de *Salvia officinalis* (SO) como el de *Genciana lutea* (GL) incrementaron la sensibilidad de *E. coli* LEMSA 2021 frente a amoxicilina. Este efecto se evidenció mejor cuando los extractos se ensayaron como *spots* (**Tabla 5**).

Tabla 5. Sensibilidad de *E. coli* del TRB a antibióticos en presencia de extractos vegetales.

Aislado	Antibiótico	Antibiótico + extracto vegetal (disco)				Antibiótico + extracto vegetal (spot)			
		McL	AT	SO	GL	McL	AT	SO	GL
<i>E. coli</i> LEMSA 2014	Amoxicilina								
	S ^a								
	Estreptomina								
	S ^b								
	Tetraciclina	R^c	R	R	R	R	R	R	R
Ciprofloxacina	S ^d								
<i>E. coli</i> LEMSA 2016	Amoxicilina								
	S								
	Estreptomina								
	S								
	Tetraciclina	S							
Ciprofloxacina	R	I	I	S	S	S	S	S	
<i>E. coli</i> LEMSA 2021	Amoxicilina	R	R	I	I	R	R	S	S
	Estreptomina	R	S	S	S	S	S	S	S
	Tetraciclina	R	R	R	R	R	R	R	R
	Ciprofloxacina								
	S								

Clasificación de los aislados como sensible (S), intermedio (I) y resistente (R), en base a los resultados obtenidos comparados con los puntos de corte para enterobacterias (CLSI, 2012). ^aAmoxicilina: S≥18, I 14-17, R≤13; ^bEstreptomina: S≥15, I 12-14, R≤11; ^cTetraciclina S≥15, I 12-14, R≤11 y ^dCiprofloxacina: S≥21, I 16-20, R≤21.

5. DISCUSIÓN

En los últimos años, la creciente incidencia de patógenos resistentes a los antimicrobianos ha despertado el interés de las comunidades científicas y farmacéuticas por el estudio de la potencial actividad antimicrobiana de sustancias derivadas de plantas, lo que llevó a un resurgimiento en el uso de hierbas medicinales en todo el mundo (Yap y col., 2014). En este contexto, numerosos extractos de hierbas han sido descritos como una fuente de agentes antimicrobianos y antioxidantes (Abdul Qadir y col., 2017). Si bien la actividad antimicrobiana de algunos de los extractos vegetales evaluados ha sido previamente reportada por otros autores, a la fecha este es el primer trabajo que estudia su efecto inhibitorio sobre aislados de *E. coli* del TRB asociadas a trastornos reproductivos, que además exhiben resistencia antimicrobiana.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis indican que los extractos de *Matricaria chamomilla* L (McL) y *Salvia officinalis* (SO) presentaron la mayor actividad antagónica, seguidos por *Aloe barberensis miller* (ABm), *Genciana lutea* (GL) y *Malva sylvestris* (MS).

Con respecto a la actividad antimicrobiana de **McL**, Munir y col. (2014) reportaron que extractos etanólicos y metanólicos obtenidos de la raíz de dicha planta presentaron un efecto antibacteriano sobre *E. coli*. Sin embargo, sus resultados evidenciaron un mayor porcentaje de actividad antibacteriana contra bacterias Gram-positivas. Aunque el mecanismo de acción de dicho extracto aún no se ha dilucidado, esta diferencia puede explicarse por el hecho de que existe una mayor complejidad de la pared que rodea a las bacterias Gram-negativas, en comparación con los microorganismos Gram-positivos (Sharifi-Rad y col., 2018).

Asimismo, se observó que el mayor efecto bactericida se obtuvo para los extractos de **McL** y **RA**. Si bien, la capacidad antiinflamatoria del extracto de **RA** ha sido descrita (Huang y col., 2008; Palanisamy y col., 2018), no se encontraron reportes previos de su acción antimicrobiana por lo que los resultados de la presente tesis cobran especial relevancia. Considerando que tanto **McL** como **RA** poseen flavonoides como principio activo, no sorprende el hecho que tengan un efecto bactericida similar.

Los resultados obtenidos con **SO** y **GL** coinciden con lo reportado previamente para microorganismos patógenos, incluida *E. coli* (Šavikin y col., 2009; Ghorbani & Esmaeilzadeh, 2017; Mirzaee y col., 2017;). Ghorbani & Esmaeilzadeh (2017) reportaron que el efecto inhibitorio de **SO** sobre bacterias Gram-negativas depende del tipo de extracto utilizado, siendo menor en los extractos etanólicos ya que su acción es debida a los aceites esenciales que posee, los cuales presentan baja solubilidad en dicho solvente. En cambio, en el presente trabajo se utilizaron extractos hidro-alcohólicos, lo cual puede explicar la mejor actividad antagónica observada.

Nuestros resultados muestran que **ABm** tuvo efecto bacteriostático sobre *E. coli*, pero no bactericida como lo describieron Abdul Qadir y col. (2017), quienes reportaron que extractos acuosos y etanólicos de **ABm** tuvieron efecto bactericida contra cepas seleccionadas de *E. coli*, entre otros patógenos estudiados. Probablemente, existan diferencias a nivel de cepas que generan mayor susceptibilidad frente a determinados factores inhibidores presentes en los extractos; además, dichos autores no usaron extractos estandarizados por lo que es muy difícil la comparación ya puede haber variaciones en la concentración del principio activo, debido a la estacionalidad y la altitud a la que se realiza la cosecha de las partes del vegetal (Sharifi-Rad y col., 2018).

Los hallazgos del presente estudio permiten concluir que el total de los extractos vegetales estudiados mostró actividad antimicrobiana en magnitud variable frente a los aislados de *E. coli* ensayados. Estos resultados toman especial relevancia ya que dichos microorganismos presentan un perfil de patogenicidad asociado a trastornos reproductivos en bovinos y solo *E. coli* LEMSA 2051 fue resistente frente a los extractos utilizados.

En base al potencial antimicrobiano de los extractos de **SO**, **GL**, **McL** y **RA** frente a *E. coli* del TRB y a los efectos antiinflamatorios reportados previamente (Mathew y col., 2004; Miraj & Alesaeidi, 2016; Ghorbani & Esmaeilzadeh, 2017; Tardugno y col., 2018; Palanisamy y col., 2018), éstos constituirían una opción para el tratamiento de trastornos reproductivos en bovinos. Sin embargo, se

requieren estudios adicionales para analizar sus aspectos toxicológicos y farmacológicos en la mucosa del TRB.

Es interesante destacar que la mayoría de los compuestos de origen vegetal reportados tienen actividad antibiótica débil, con varios órdenes de magnitudes menor que la de los antibióticos comunes (Tegos y col., 2002). En este contexto las interacciones sinérgicas son de vital importancia en fitomedicina ya que permiten explicar la eficacia de dosis aparentemente bajas de constituyentes activos en un producto herbáceo (Aiyegoro y col. 2009). Este concepto se basa en la idea de que un extracto de una planta ofrece ventajas sobre un solo compuesto aislado (Borges y col., 2016). Los efectos sinérgicos se pueden producir si la interacción entre los componentes del extracto resulta en un aumento de la solubilidad y mejora la biodisponibilidad de los compuestos activos. La utilidad de los productos vegetales como atenuadores de virulencia y potenciadores de antibióticos ha sido muy estudiado (González-Lamothe y col., 2009). Las moléculas que bloquean la resistencia a los antibióticos pueden tener un impacto clínico significativo y, así, mejorar la actividad antibiótica, por lo tanto, se les llama adyuvantes de antibióticos (Borges y col., 2016). El éxito más notable en esta estrategia se ha logrado con los antibióticos β -lactámicos (Toussaint y col., 2015).

Diversas investigaciones se han realizado para extender este enfoque a otras clases de antibióticos a través de la exploración de nuevos compuestos (Borges y col., 2016). Algunos de ellos, por ejemplo, los lipopéptidos cíclicos policatiónicos y los péptidos antimicrobianos derivados de la polimixina B, han sido incluidos con éxito a un ensayo de combinación con cepas clínicas resistentes a los antibióticos (Bolla y col., 2011). De igual manera, los resultados presentados dan evidencia, *in vitro*, del incremento de la sensibilidad *E. coli* vaginales a antibióticos en presencia de extractos vegetales. Los extractos de **SO** y **GL** incrementaron la sensibilidad de los aislados resistentes a ciprofloxacina, amoxicilina y estreptomina bajo las condiciones de estudio utilizadas. Considerando que los principios activos de mayor relevancia tanto de SO como GL son ácidos orgánicos, es posible que dichos compuestos afecten alguno de los

mecanismos de resistencia bacterianos descritos por Davies & Davies (2010) comunes para dichos antibióticos (bomba de eflujo y modificación del sitio diana). Por su parte, los extractos de **McL** y **AT** aumentaron la sensibilidad de *E. coli* LEMSA 2016 y LEMSA 2021 frente a ciprofloxacina y estreptomina, respectivamente. Ambos extractos poseen aceites esenciales como principio activo, por lo que se puede inferir que dichos compuestos pueden ser adyuvantes de los antibióticos ensayados. Los aceites esenciales son conocidos por contener una amplia gama de polifenoles y terpenoides. Estos fenoles poseen una fuerte afinidad de unión a diferentes estructuras moleculares, tales como proteínas o glicoproteínas debido a su gran lipofilicidad: por lo tanto, tienen gran afinidad por las membranas celulares y exhiben alto potencial para penetrarlas; se espera, entonces, que atraviesen las paredes y membranas celulares de Gram-negativas, lo que lleva a la fuga de contenidos citosólicos (Yap y col., 2014). Estudios complementarios deben realizarse para determinar la naturaleza del potencial sinérgico de las combinaciones de estos extractos vegetales y los antibióticos utilizados.

El comportamiento de los aislados resistentes a tetraciclina no fue modificado en presencia de ninguno de los cuatro extractos ensayados. Esto puede deberse al tipo de mecanismo de resistencia a tetraciclina descritos en *E. coli* que incluye además del eflujo activo, la protección ribosomal e inactivación enzimática (Mosquito y col., 2011). Este resultado es desafortunado, ya que tetraciclina se utiliza de rutina no solo en el tratamiento a humanos, sino también en el tratamiento veterinario y como factor de crecimiento (Karami y col., 2006).

El presente estudio indica que la combinación de los extractos vegetales de **McL**, **AT**, **SO** y **GL** con los antibióticos de uso rutinario en trastornos uterinos de hembras bovinas, tendría un potencial para el desarrollo de nuevos tratamientos para preservar la fertilidad y reducir la farmacoresistencia.

6. CONCLUSIONES PARCIALES

En base a los resultados descriptos se concluye:

- Los extractos de: *Aloe Barberensis miller*, *Salvia officinalis*, *Genciana lutea*, *Malva sylvestris* y *Matricaria chamomilla L* presentan un potencial inhibitorio que podría utilizarse en el control de la colonización vaginal de *E. coli* asociadas a vacas con trastornos reproductivos.
- Los extractos de *Matricaria chamomilla L* y *Ruscus aesculeatus* deben considerarse en el diseño de una estrategia destinada al tratamiento de vacas con Vtr, debido a su buen efecto bactericida a bajas concentraciones, frente a las *E. coli* más patogénicas.
- La incrementada sensibilidad de *E. coli* del TRB a ciprofloxacina y a estreptomina en presencia de extractos de *Salvia officinalis*, *Genciana lutea*, *Matricaria chamomilla L* y *Aloysia triphylla*, abre la posibilidad de diseñar protocolos con menores dosis de antibióticos para uso rutinario en el ganado.
- Extractos hidroalcohólicos de *Salvia officinalis* (SO) o de *Genciana lutea* (GL) pueden considerarse conjuntamente con amoxicilina para la optimización de una estrategia destinada a tratar las Vtr por *E. coli* refractarias a los tratamientos con dichos antibióticos.



CONCLUSIONES GENERALES

Méd. Vet. Candelaria Gonzalez Moreno

CONCLUSIONES GENERALES

- El diagnóstico de vaginitis debe hacerse en base a la evaluación citológica, incrementando la sensibilidad de la simple exploración vaginoscópica de la mucosa y su descarga.
- El protocolo de sincronización de celo con PRID induce cambios en la comunidad microbiana vaginal residente de vaquillonas generando perfiles de la microbiota diferentes de las de vaquillonas no sincronizadas que incluyen una pérdida de la riqueza microbiana, así como la presencia de poblaciones potencialmente patógenas en el momento de la IA, tales como la familia *Pasteurellaceae* y los géneros *Fusobacterium*, *Leptotrichiaceae* y *Prevotella*.
- Por primera vez se describe el perfil microbiano vaginal asociado al SVR, con una estructura poblacional bacteriana característica y diferente de la de vaquillonas sanas, el cual incluye combinaciones de microorganismos patógenos uterinos reconocidos, tales como la familia *Pasteurellaceae* y el género *Porphyromonas*.
- *Escherichia coli* es un integrante obligado de la microbiota vaginal en vacas adultas con trastorno reproductivos (enfermedad uterina posparto y síndrome de vaca repetidora); sin embargo, no siempre parece estar presente en vagina de vaquillonas sanas. Asimismo, las poblaciones de *E. coli* vaginales en este último grupo son genéticamente más diversas que las de vacas con trastornos reproductivos (Vmt y Vr).
- Por primera vez se describe la conformación filogenética de las poblaciones de *E. coli* nativas vaginales bovinas, las que están constituidas por los filogrupos A, B1 y D, pero no por B2. La contribución del filogrupo B1 es mayor en la Vr respecto de las vaquillonas sanas o las Vmt.
- La microbiota vaginal bovina constituye un reservorio de *E. coli* que expresan resistencia antimicrobiana. Especialmente a Enrofloxacina, Ampicilina, Estreptomicina y Tetraciclina. Y *E. coli* multirresistentes se asocian a las microbiotas vaginales de vacas con trastornos reproductivos.
- La prevalencia baja o nula de factores genéticos de virulencia intestinal indica probablemente, una especificidad en el nicho, al menos para excluir las *E. coli* patógenas intestinales de las poblaciones vaginales bovinas.

- La colonización vaginal por *E. coli* del filogrupo B1, portadora de los genes *fyuA*, *csgA* y *kpsMTII*, productora de biofilm y/o que exprese fimbria curly/celulosa constituiría un factor de riesgo para el desarrollo del Síndrome de vaca repetidora.
- Las poblaciones de *E. coli* vaginales de riesgo de enfermedad uterina posparto responden total o parcialmente al perfil: portación de los genes *fyuA*, *csgA*, *agn43*, así como la expresión de: movilidad, producción de curly/celulosa y formación de biofilm.
- Extractos de *Matricaria chamomilla* L, *Salvia officinalis*, *Genciana lutea*, *Aloysia triphylla*, *Ruscus aesculeatus*, *Aloe Barberensis miller* y *Malva sylvestris* mostraron actividad inhibitoria sobre *E. coli* asociadas a Vtr y Vr, incluso algunos incrementaron la sensibilidad frente a antibióticos; por lo que dichos extractos podrían combinarse entre ellos o con antibióticos en bajas dosis, para ser incluidos en protocolos de manejo reproductivo a fin de preservar la sanidad del TRB.



PROYECCIONES

Méd. Vet. Candelaria Gonzalez Moreno

PROYECCIONES

- Evaluar si los cambios en la microbiota vaginal por efecto del PRID inciden en la tasa de preñez en vaquillonas inseminadas.
- Profundizar en el estudio de la diversidad clonal de las *E. coli* nativas del TRB mediante el sistema EcMLST, a fin de determinar si ST conocidas se asocian a Vmt o Vr, o si existen ST no descriptas.
- Evaluar los determinantes genéticos de resistencia en aquellos aislados que presentaron multirresistencia.
- Investigar la presencia de otros factores de virulencia asociados a cepas ExPEC, como ser: *neuC*, *ompA*, *iroN*, *iss*, así como los diferentes alelos descriptos para la fimbria P y el gen *agn43*.
- Evaluar la capacidad de adhesión a células del TRB de las *E. coli* con mayor potencial patogénico aisladas de Vtr.
- Valorar la citotoxicidad de los extractos seleccionados sobre células epiteliales del TRB.
- Evaluar el efecto sinérgico de los extractos y antibióticos mediante el índice de concentración inhibitoria fraccional (FICI); de *Salvia officinalis*, *Genciana lutea*, *Matricaria chamomilla* L y *Aloysia triphylla* y los antibióticos ciprofloxacina y estreptomina; y por otra parte, el de *Salvia officinalis* o *Genciana lutea* y amoxicilina, frente a las *E. coli* de Vtr más resistentes.
- Evaluar la incidencia de la vaginitis en un protocolo de IATF con PRID combinado con los extractos que mostraron actividad sobre las *E. coli* con potencial patogénico del TRB.



ABREVIATURAS

Méd. Vet. Candelaria Gonzalez Moreno

ABREVIATURAS

%P: Porcentaje de Preñez.

(P/V): Peso/Volumen

(V/V): Volumen/Volumen

°C: Grados Centígrados

μL: Microlitro

Abm: *Aloe barberensis miller*

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADNr 16S: Ácido Desoxirribonucleico Ribosomal 16S

AINEs: Antiinflamatorios No Esteroides

ALN: Agua Libre De Nucleasas

AMC: Amoxicilina/Ácido Clavulánico

AMP: Ampicilina.

APEC: *Escherichia coli* Patógena Aviar

AS: *Allium sativum*

AT: *Aloysia triphylla*

Bas: Colonia Marrón y Lisa

Bdar: Colonia Marrón, Seca y Rugosa

BHI: Medio Cerebro Corazón

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

CAZ: Ceftazidima

CBD: Calgary Biofilm Device

CICCRA: Industria y Comercio de Carnes y Derivados de la República Argentina

CIM: Concentración Inhibitoria Mínima

CL: Cuerpo Lúteo

CLSI: en inglés *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CO: *Calendula officinalis*

CP: componentes principales

CV: Cristal Violeta

DGGE: en inglés *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*

DO: Densidad Óptica

DS: Desvío Estándar

DV: Descarga Vaginal

E. coli: *Escherichia coli*

EE.UU.: Estados Unidos

EFSA: Agencia Europea de Seguridad Alimentaria
EFT: Ceftiofur.
EHEC: *Escherichia coli* Entero Hemorrágica
EnPEC: *Escherichia coli* Patógena Endometrial
ENR: Enrofloxacina.
EP: *Echinacea purpura*
EPEC: *Escherichia coli* Enteropatógena
ERIC-PCR: en inglés *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* PCR
ETEC: *Escherichia coli* Enterotoxigénica
EV: Extracto Vegetal
ExPEC: *Escherichia coli* Patógena Extraintestinal
FADA: Fundación Agropecuaria para el Desarrollo de Argentina
GL: *Genciana lutea*
GR: Glóbulos Rojos
H₂S: Ácido Sulfídrico
Hs.: Horas
I: Inmóvil
IA: Inseminación Artificial
IATF: Inseminación Artificial A Tiempo Fijo
IM: Intramuscular
INRA: en francés *Institut National de la Resherche Agronomique*
INTA-Leales: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuria-Leales
IPC: Intervalo Parto-Concepción
IPS: Intervalo Preñez A Primer Servicio
IQ: Rango Intercuartil.
ITU: Infecciones del Tracto Urinario
LB: Luria Bertani.
LEMSA: Laboratorio de Ecología Microbiana y Sanidad Animal
LIA: Lisina, Hierro y Agar
LPS: Lipopolisacárido
Ma: Movilidad Alta
Mb: Movilidad Baja
McL: *Matricaria chamomilla* L
MDR: aislados multiresistentes
MH: Agar Muller Hinton

Min: Minutos
MLST: en inglés *Multilocus Sequence Typing*:
Mm: Movilidad Media
MPEC: *Escherichia coli* Patógena Mamaria
MS: *Malva sylvestris*
Nacl: Cloruro De Sodio
NET: red extracelular de fibrina
NMDR: aislados no multirresistentes
NMEC: *Escherichia coli* Asociada A Meningitis Neonatal
NTEC: *Escherichia coli* Necrotoxigénica
OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal
OTU: en inglés *Operational Taxonomic Units*
Pb: Pares de Bases
PBS: Solución Salina Bufferada con Fosfato
PCoA: en inglés *Principal Coordinates Analysis*
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
Pdar: Colonia Rosa, Seca y Rugosa
PFGE: electroforesis en gel de campo de pulso
PG: *Panax ginseng*
PGE: Prostaglandina E.
PGF2 α : Prostaglandina F2 α
PID: Enfermedad De Inflamación Pélvica
PMN: Leucocitos Polimorfonucleares
PRID: en inglés *Progesterone-Releasing Intraovaginal Device*
QIIME: en inglés *Quantitative Insights into Microbial Ecology*
RA: *Ruscus aesculeatus*
RAPD: en inglés *Random amplified polymorphic DNA*:
RC: Rojo Congo
Rdar: Colonia Roja, Seca y Rugosa
REP: en inglés *Repetitive Extragenic Palindromic*
RM: Rojo De Metilo.
Rojo Congo Negativo (RC-)
Rojo Congo Positivo (RC+)
S: Estreptomicina.
S: Segundos

SA: Sociedad Anónima
Saw: Colonia Lisa y Blanca
SCV: Score De Citología Vaginal
SDV: Score De Descarga Vaginal
SEPEC: *Escherichia coli* Causante de Sepsis
SF: Solución Fisiológica
SIM: Sulfuro De Hidrogeno-Indol-Movilidad
SO: *Salvia officinalis*
STA: Enterotoxina termoestable
STE: Buffer de cloruro sódico-Tris-EDTA
STEC: *Escherichia coli* Productora de Toxina Shiga-Like
STX: Sulfametoxasol/Trimetoprima
SVR: Síndrome de Vaca Repetidora de celo
TE: Tetraciclina
TLR4: Receptores Tipo Toll
TR: Tracto Reproductor
TRB: Tracto Reproductor Bovino
TSI: Agar Hierro Triple Azúcar
UFC: Unidades Formadoras de Colonias
UPEC: *Escherichia coli* Uropatógena
UPGMA: en inglés *Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*
UTO: Unidad Taxonómica Operativa
UV: Ultravioleta
V: Volts
VF: Factores de Virulencia
Via: Vaquillonas con vaginitis muestreadas el día 11 del protocolo de sincronización de ovulación
Vmt: Vacas con enfermedad uterina
Vp: Vaquillonas sincronizadas muestreadas el día 60 del protocolo de sincronización para IATF
VP: Voges-Proskauer
Vr: Vacas repetidoras de celo
Vs: Vaquillonas clínicamente sanas
Vtr: Vacas con trastorno reproductivo



BIBLIOGRAFÍA

Méd. Vet. Candelaria Gonzalez Moreno

BIBLIOGRAFÍA

- Aarestrup FM. (2015) The livestock reservoir for antimicrobial resistance: a personal view on changing patterns of risks, effects of interventions and the way forward. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 5;370(1670), 20140085.
- Abdul Qadir M, Shahzadi SK, Bashir A, Munir A, Shahzad S. (2017) Evaluation of Phenolic Compounds and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Some Common Herbs. *Int J Anal Chem* 2017, 3475738.
- AHVLA Disease Surveillance Report-April (2014) *Helicobacter ovis*: potential novel cause of bovine abortion. [https:// www.gov.uk/ government/ uploads/ system/ uploads/](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/)
- Aiyegoro OA, Okoh AI. (2009) Use of bioactive plant products in combination with standard antibiotics: Implications in antimicrobial chemotherapy. *J Med Plants Res* 3, 1147–1152.
- Ale CE, Torres Luque A, Gonzalez Moreno C, Otero MC. (2015) Microencapsulation of Bovine Vaginal Lactobacilli in Alginate using Emulsion-gelation: Freeze-drying, Storage and Antimicrobial Activity. *J of Bioproc & Biotech* 5:11.
- Ali HFM, El-Beltagi HS, Nasr NF. (2011) Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of *Aloysia triphylla* *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry* 10(11), 2689 – 2699.
- Alm EW, Walk ST, Gordon DM. (2011) The niche of *Escherichia coli*. En: *Population Genetics of Bacteria*. Ed: Walk ST, Feng PCH. pp, 107-123. ASM Press, Washington DC, USA, pp 107–123.
- Ardakani MA, Ranjbar R. (2016) Molecular typing of uropathogenic *E. coli* strains by the ERIC-PCR method *Electron Physician* 8, 2291-2296.
- Argue B, Chousalkar KK, Chenoweth PJ. (2013) Presence of *Ureaplasma diversum* in the Australian cattle population. *Australian Veterinary Journal*, 91, 99–101.
- Arjoon AV, Saylor CV, May M. (2012) In Vitro efficacy of antimicrobial extracts against the atypical ruminant pathogen *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. *BMC Complement Altern Med* 12, 169.
- Ateba CN, Mbewe M. (2014) Genotypic Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 Isolates from Different Sources in the North-West Province, South Africa, Using Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR Analysis. *Int J Mol Sci* 15(6), 9735–9747.
- Awan UA, Ali S, Shahnawaz AM, Shafique I, Zafar A y col. (2017) Biological activities of *Allium sativum* and *Zingiber officinale* extracts on clinically important bacterial pathogens, their phytochemical and FT-IR spectroscopic analysis. *Pak J Pharm Sci* 30(3), 729-745.
- Azawi OI. (2008) Postpartum uterine infection in cattle. *Anim Reprod Sci* 105, 187–208.
- Azevedo JB, Silva GS, Rocha PS, Pitchenin LC, Dutra V y col. (2017) Presence of *Ureaplasma diversum* in the genital tracts of female dairy cattle in Mato Grosso State, Brazil. *Trop Anim Health Prod* 49(2), 311-316.
- Bajcsy AC, Szenci O, van der Weijden GC, Doornenbal A, Maassen F y col. (2006) The effect of a single oxytocin or carbetocin treatment on uterine contractility in early postpartum dairy cows. *Theriogenology* 20;65(2), 400-414.
- Baldy-Chudzik K, Mackiewicz P, Stosik M. (2008) Phylogenetic background, virulence gene profiles, and genomic diversity in commensal *Escherichia coli* isolated from ten mammal species living in one zoo. *Vet Microbiol* 18, 131(1-2), 173-184.
- Baltaci MO, Genc B, Arslan S, Adiguzel G, Adiguzel A. (2016) Isolation and Characterization of Thermophilic Bacteria from Geothermal Areas in Turkey and Preliminary Research on Biotechnologically Important Enzyme Production. *Geomicrobiol J* doi: 10.1080/01490451.2015.1137662
- Barbera P, Alfonso M, Agnelli L. (2003) La ganadería competitiva es tan competitiva como la agricultura. ¿Sojizamos el problema o invernamos una solución? III Seminario UCA-Hereford. Centro De Altos Estudios “Jorge Gándara”.

- Barrett AJ, Murray RD, Christley RM, Dobson H, Smith RF. (2009) Effects of the administration of oxytocin or carbetocin to dairy cows at parturition on their subsequent fertility. *Vet Rec* 21;165(21), 623-626.
- Bej AK, Mahbubani MH, Dicesare JL, Atlas RM. (1991) Polymerase chain reaction-gene probe detection of microorganisms by using filter-concentrated samples. *Appl Environ Microbiol* 57(12), 3529-3534.
- Bélanger L, Garenaux A, Harel J, Boulianne M, Nadeau E y col. (2011) *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 62(1), 1-10.
- Berg RD. (1999) Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Adv Exp Med Biol* 473, 11-30.
- Bhat FA, Bhattacharyya HK, Syed Akram Hussain SA. (2014) White side test: a simple and rapid test for evaluation of nonspecific bacterial genital infections of repeat breeding cattle. *Vet Res Forum* 5, 177-180.
- Bicalho ML, Lima FS, Machado VS, Meira Jr EB, Ganda EK y col. (2016) Associations among *Trueperella pyogenes*, endometritis diagnosis, and pregnancy outcomes in dairy cows. *Theriogenology* 85(2), 267-274.
- Bicalho ML, Machado VS, Oikonomou G, Gilbert RO, Bicalho RC. (2012) Association between virulence factors of *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum*, and *Arcanobacterium pyogenes* and uterine diseases of dairy cows. *Vet Microbiol* 25;157(1-2), 125-31.
- Bicalho MLS, Machado VS, Higgins CH, Lima FS, Bicalho RC. (2017b) Genetic and functional analysis of the bovine uterine microbiota. Part I: Metritis versus healthy cows. *J Dairy Sci* 100(5), 3850-3862.
- Bicalho MLS, Santin T, Rodrigues MX, Marques CE, Lima SF y col. (2017a). Dynamics of the microbiota found in the vaginas of dairy cows during the transition period: Associations with uterine diseases and reproductive outcome. *J Dairy Sci* 100(4), 3043-3058.
- Bicalho RC, Machado VS, Bicalho ML, Gilbert RO, Teixeira AG y col. (2010) Molecular and epidemiological characterization of bovine intrauterine *Escherichia coli*. *J Dairy Sci* 93, 5818-5830.
- Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Mora A, Alonso MP y col. (2002) Enterobacterias: características generales. Género *Escherichia*. En: *Manual de Microbiología Veterinaria*, Ed. Vadillo S, Píriz S, Mateos E. pp, 301-325. McGraw-Hill Interamericana, Madrid, España.
- Blanco M, Padola NL, Krüger A, Sanz ME, Blanco JE y col. (2004) Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. *Int Microbiol* 7(4), 269-276.
- Blum S, Zamir L, Krifucs O, Goshen T, Brenner J y col. (2012) Assessment of *Porphyromonas levii* antibody status of cattle pre-and post partum and the relationship of antibody levels to the development of bovine necrotic vulvovaginitis. *Isr J Vet Med* 67, 45 -47.
- Bok E, Mazurek J, Stosik M, Wojciech M, BaldyChudzik K. (2015) Prevalence of Virulence Determinants and Antimicrobial Resistance among Commensal *Escherichia coli* Derived from Dairy and Beef Cattle. *Int J Environ Res Public Health* 12(1), 970-985.
- Bokranz W, Wang X, Tschäpe H, Römling U. (2005) Expression of cellulose and curli fimbriae by *Escherichia coli* isolated from the gastrointestinal tract. *J Med Microbiol* 54(12), 1171-1182.
- Bokulich NA, Subramanian S, Faith JJ, Gevers D, Gordon JI y col. (2013) Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat Methods* 10, 57-59.
- Bolla JM, Alibert-Franco S, Handzlik J, Chevalier J, Mahamoud A y col. (2011) Strategies for bypassing the membrane barrier in multidrug resistant Gram-negative bacteria. *FEBS Lett* 585, 1682-1690.

- Borges A, Abreu AC, Dias C, Saavedra MJ, Borges F y col. (2016) New Perspectives on the Use of Phytochemicals as an Emergent Strategy to Control Bacterial Infections Including Biofilms. *Molecules* 21, 877.
- Bracke N, Van Poucke M, Baert B, Wynendaele E, De Bels L y col. (2014) Identification of a microscopically selected microorganism in milk samples. *J Dairy Sci* 97, 609–615.
- Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Huntley J y col. (2012) Ultrahigh-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J* 6, 1621–1624.
- Chenault JR, McAllister JF, Chester Jr ST, Dame KJ, Kausche FM y col. (2004) Efficacy of ceftiofur hydrochloride sterile suspension administered parenterally for the treatment of acute postpartum metritis in dairy cows. *J Am Vet Med Assoc* 224, 1634–1639.
- Cho A, Roh YS, Uyangaa E, Park S, Kim JW y col. (2013) Protective effects of red ginseng extract against vaginal herpes simplex virus infection *J Ginseng Res* 37(2), 210-218.
- Clemmons BA, Reese ST, Dantas FG, Franco GA, Smith TPL y col. (2017) Vaginal and Uterine Bacterial Communities in Postpartum Lactating Cows. *Front Microbiol* 8, 1047.
- Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. (2000) Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 66, 4555–4558.
- Clermont O, Lescat M, O'Brien CL, Gordon DM, Tenaillon O, Denamur E. (2008) Evidence for a human specific *Escherichia coli* clone. *Environ Microbiol* 10, 1000–1006.
- Clermont O, Olier M, Hoede C, Diancourt L, Brisse S y col. (2011) Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. *Infect Genet Evol* 11(3), 654–62.
- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). (2012) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-second Informational Supplement. M100-S22 CLSI, Wayne, PA.
- Coura FM, de Araújo Diniz S, Mussi JMS, Silva MX, Lage AP y col. (2016) Characterization of virulence factors and phylogenetic group determination of *Escherichia coli* isolated from diarrheic and non-diarrheic calves from Brazil. *Folia Microbiol (Praha)* 62(2), 139-144.
- Cummings KJ, Aprea VA, Altier C. (2014) Antimicrobial Resistance Trends Among *Escherichia coli* Isolates Obtained from Dairy Cattle in the Northeastern United States, 2004–2011. *Foodborne Pathogens and Disease* 11(1), 61–67.
- Cunha F, Jeon SJ, Daetz R, Vieira-Neto A, Laporta J y col. (2018) Quantifying known and emerging uterine pathogens, and evaluating their association with metritis and fever in dairy cows. *Theriogenology* 114, 25-33.
- Da Silva GJ, Mendonça N. (2012) Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*. *Virulence* 3(1), 18-28.
- Daetz R, Cunha F, Bittar JH, Risco CA, Magalhaes F y col. (2016) Clinical response after chitosan microparticle administration and preliminary assessment of efficacy in preventing metritis in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 99, 8946–8955.
- Davies J, Davies D. (2010) Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 74(3), 417-433.
- de Brito BG, Carlos L, Gaziri J, Vidotto MC. (2003) Virulence factors and clonal relationships among *Escherichia coli* strains isolated from broiler chickens with cellulitis. *Infect Immun* 71, 4175–4177.
- Deng Q, Odhiambo JF, Farooq U, Lam T, Dunn SM y col. (2015a) Intravaginal lactic acid bacteria modulated local and systemic immune responses and lowered the incidence of uterine infections in periparturient dairy cows. *PLoS One* 10, 1–16.
- Deng Q, Odhiambo JF, Farooq U, Lam T, Dunn SM y col. (2015b) Intravaginally administered lactic acid bacteria expedited uterine involution and modulated hormonal profiles of transition dairy cows. *J Dairy Sci* 98, 6018–6028.

- DiGuilio DB, Callahan BJ, McMurdie PJ, Costello EK, Lyell DJ y col. (2015) Temporal and spatial variation of the human microbiota during pregnancy. *Proc Natl Acad Sci USA* 112, 11060–11065.
- Dogan B, Klaessig S, Rishniw M, Almeida RA, Oliver SP y col. (2006) Adherent and invasive *Escherichia coli* are associated with persistent bovine mastitis. *Vet Microbiol* 116(4), 270-282.
- Dohmen, M. J. W., Louis J. A. C. (1996) Bacteriología de la endometritis en vacas y sus implicaciones para el tratamiento efectivo. XIX Congreso Mundial de Buiatria. Edimburgo.
- Drillich M, Beetz O, Pfutzner A, Sabin M, Sabin HJ y col. (2001) Evaluation of a systemic antibiotic treatment of toxic puerperal metritis in dairy cows. *J Dairy Sci* 84, 2010-2017.
- Duarte M, Leme EE, Delarmelina C, Soares AA, Figueira GM y col. (2007) Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *J Ethnopharmacol* 111(2), 197-201.
- Duffy P, Crowe MA, Austin EJ, Mihm M, Boland MP y col. (2004) The effect of eCG or estradiol at or after norgestomet removal on follicular dynamics, estrus and ovulation in early post-partum beef cows nursing calves. *Theriogenology* 61, 725-734.
- Duriez P, Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E, Chaventré A y col. (2001) Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology* 147, 1671-1676.
- Dyer JG, Sriranganathan N, Nickerson SC, Elvinger F. (2007) Curli production and genetic relationships among *Escherichia coli* from cases of bovine mastitis. *J Dairy Sci* 90(1), 193-201.
- Edgar RC. (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460-2461.
- Efstratiou E, Hussain AI, Nigam PS, Moore JE, Ayub MA y col. (2012). Antimicrobial activity of *Calendula officinalis* petal extracts against fungi, as well as Gram-negative and Gram-positive clinical pathogens. *Complement Ther Clin Pract* 18(3), 173-176.
- El Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) <http://www.senasa.gob.ar/cadena-animal/bovinos-y-bubalinos/informacion/informes-y-estadisticas>.
- El Instituto Nacional de Estadística y Censos de la República Argentina (INDEC) www.indec.gov.ar
- Elad D, Friedgut O, Alpert N, Stram Y, Lahav D y col. (2004) Bovine necrotic vulvovaginitis associated with *Porphyromonas levii*. *Emerg Infect Dis* 10, 505–507.
- Emődy L, Kerényi M, Nagy G. (2003) Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents* 22, 29-33.
- Olsen A, Jonsson A, Normark, S. (1989) Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature* 20, 338(6217), 652-655.
- Escobar-Páramo P, Le Menac'h A, Le Gall T, Amorin C, Gouriou S y col. (2006) Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. *Environ Microbiol* (11), 1975-1984.
- Ewers C, Li G, Wilking H y col. (2007) Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? *Int J Med Microbiol* 297, 163–176.
- Fan ZY, Li XR, Mao DP, Zhu GF, Wang SY y col. (2009) Could nested PCR be applicable for the study of microbial diversity? *World J Microbiol Biotechnol* 25, 1447–1452.
- Ferguson JD, Galligan DT, Thomsen N. (1994) Principal descriptors of body condition score in Holstein cows. *J Dairy Sci* 77(9), 2695-2703.
- Ferreira R, Coelho de Oliveira JF, Antoniazzi AQ, Pimentel CA, Ferrugem JC y col. (2008) Relationship between clinical and postmortem evaluation in repeat breeder beef cows. *Cienc Rural* 38.
- Ferreira RM, Conti TL, Gonçalves RL, Souto LA, Sales JNS y col. (2018) Synchronization treatments previous to natural breeding anticipate and improve the pregnancy rate of postpartum primiparous beef cows. *Theriogenology* 114, 206–211.

- File TM, Srinivasan A, Bartlett JG. (2014) Antimicrobial stewardship: Importance for patient and public health. *Clin Infect Dis* 59, 93–96.
- Fischer-Tenhagen C, von Krueger X, Heuwieser W. (2012) Short communication: Evaluation of vaginal discharge following treatment with a progesterone insert. *J Dairy Sci*, 95, 4447–4451.
- Fishman, N. (2006) Antimicrobial stewardship. *Am J Infect Contr* 34, 55–63.
- Fitzpatrick JL, Nolan AM, Lees P, May SA. (2004) Inflammation and pain. En: *Bovine Medicine*. 2nd. pp, 1045–1066. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Fontana C, Cocconcelli PS, Vignolo G. (2005) Monitoring the bacterial population dynamics during fermentation of artisanal Argentinean sausages. *Int J Food Microbiol* 103, 131–142.
- Fox EM, deLappe N, Garvey P, McKeown P, Cormican M y col. (2012) PFGE analysis of *Listeria monocytogenes* isolates of clinical, animal, food and environmental origin from Ireland. *J Med Microbiol* 61(4), 540–547.
- Franck SM, Bosworth BT, Moon HW. (1998) Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves. *J Clin Microbiol* 36(6), 1795–1797.
- Frazer GS. (2005) A Rational Basis for Therapy in the Sick Postpartum Cow. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 21(2), 523–68.
- Friedman ND, Temkin E, Carmeli Y. (2016) The negative impact of antibiotic resistance. *Clin Microbiol Infect* 22, 416–422.
- Galarza Álvarez LR. (2013) Determinación del poder antibiótico in vitro del extracto etanólico del propóleo sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* presentes en metritis puerperal bovina. Tesis doctoral. Facultad de ciencias agropecuarias. Universidad de Cuenca. Ecuador.na. Cuba.
- Galetto A. (2018) Diagnóstico competitivo del sector lácteo argentino. para el Observatorio de la Cadena Láctea Argentina – Fundación para la Promoción y Desarrollo de la Cadena Láctea Argentina. Garénaux A, Caza M, Dozois CM. (2011) The Ins and Outs of siderophore mediated iron uptake by extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Vet Microbiol* 21, 153(1-2), 89–98.
- Genís S, Bach À, Fàbregas F, Arís A (2016). Potential of lactic acid bacteria at regulating *Escherichia coli* infection and inflammation of bovine endometrium. *Theriogenology* 85, 625–637.
- Genís S, Cerri RLA, Bach À, Silper BF, Baylão M y col. (2018) Pre-calving Intravaginal Administration of Lactic Acid Bacteria Reduces Metritis Prevalence and Regulates Blood Neutrophil Gene Expression After Calving in Dairy Cattle. *Front Vet Sci* 21, 5–135.
- Ghorbani A, Esmailizadeh M. (2017) Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. *J Tradit Complement Med* 7(4), 433–440.
- Gibbons JF, Boland F, Buckley JF, Butler F, Egan J y col. (2014) Patterns of antimicrobial resistance in pathogenic *Escherichia coli* isolates from cases of calf enteritis during the spring-calving season. *Vet Microbiol* 14;170(1-2), 73–80.
- Gilbert RO. (2004) Uterine disease in the postpartum period. En: *Proceedings of the 15th International Congress on animal reproduction*. p. 66–73.
- Gilbert RO. (2018) <https://www.msdsvetmanual.com/reproductive-system/vulvitis-and-vaginitis-in-large-animals/overview-of-vulvitis-and-vaginitis-in-large-animals>
- Gonzalez Moreno C, Otero MC. (2015) Basis for the Inclusion of Medicinal Plant Extracts and other Biocompounds in a Veterinary Probiotic Product. *Int J Indige Med Plants* 48, 1904–1915.
- González-Lamothe R, Mitchell G, Gattuso M, Diarra MS, Malouin F y col. (2009) Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens. *Int J Mol Sci* 10, 3400–3419.
- Gordon DM, Clermont O, Tolley H, Denamur E. (2008) Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environ Microbiol* 10(10), 2484–2496.
- Gordon DM, Cowling A. (2003) The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology* 149, 3575–3586.

- Gurunathan S, Choi YJ, Kim JH. (2018) Antibacterial Efficacy of Silver Nanoparticles on Endometritis Caused by *Prevotella melaninogenica* and *Arcanobacterium pyogenes* in Dairy Cattle. *Int J Mol Sci* 16, 19(4).
- Gyles CL, Fairbrother JM. (2010) *Escherichia coli*. En: Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. Ed. Gyles CA, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO. pp, 231-265. Blackwell Publishing, Iowa, EE.UU.
- Hacioglu M, Dosler S, Birteksoz Tan AS, Otuk G. (2017) Antimicrobial activities of widely consumed herbal teas, alone or in combination with antibiotics: an invitro study. *Peer J* 5, e3467.
- Haimerl P, Heuwieser W. (2014) Invited review: Antibiotic treatment of metritis in dairy cows: A systematic approach. *J Dairy Sci* 97, 6649-6661.
- Hammer KA, Carson CF, Riley TV. (1999) Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Applied Microbiol* 86, 985-990.
- Hancock V, Ferrieres L, Klemm P. (2008) The ferric yersiniabactin uptake receptor FyuA is required for efficient biofilm formation by urinary tract infectious *Escherichia coli* in human urine. *Microbiology* 154, 167-175.
- Hannan TJ, Mysorekar IU, Chen SL, Walker JN, Jones JM, y col. (2008) LeuX tRNA dependent and -independent mechanisms of *Escherichia coli* pathogenesis in acute cystitis. *Mol Microbiol* 67, 116-128.
- Harwalkar A, Gupta S, Rao A, Srinivasa H. (2014) Lower prevalence of *hlyD*, *papC* and *cnf-1* genes in ciprofloxacin-resistant uropathoge. *J Infect Public Health* 7(5), 413-419.
- Hendriksen RS, Mevius DJ, Schroeter A, Teale C, Meunier D y col. (2008) Prevalence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens isolated from cattle in different European countries: 2002-2004. *Acta Vet Scand* 50, 28-37.
- Heppelmann M, Volland J, Pfarrer C, Kietzmann M, Bäumer W y col. (2018) Effects of oxytocin and PGF2 α on uterine contractility in cows with and without metritis-An in-vitro study. *Anim Reprod Sci* 188, 144-154.
- Herrero-Fresno A, Larsen I, Olsen JE. (2015) Genetic relatedness of commensal *Escherichia coli* from nursery pigs in intensive pig production in Denmark and molecular characterization of genetically different strains. *J Appl Microbiol* 119(2), 342-353.
- Herzer PJ, Inouye S, Inouye M, Whittam TS. (1990) Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 172, 6175-6181.
- Hidalgo LG, Catena M, Petreigne EH, Seguí R. (2011) Principales variables que afectan la preñez en rodeos de cría de la Cuenca del Salado (servicio 2009-2010). En: *Vet vol.13 no.1 Ciudad Autónoma de Buenos Aires ene./jun. 2011*
- Huang B, Fettweis JM, Brooks JP, Jefferson KK, Buck GA. (2014) The changing landscape of the vaginal microbiome. *Clin Lab Med* 34, 747-761.
- Huang YL, Kou JP, Ma L, Song JX, Yu BY. (2008) Possible mechanism of the anti-inflammatory activity of ruscogenin: role of intercellular adhesion molecule-1 and nuclear factor-kappaB. *J Pharmacol Sci* 108(2), 198-205.
- Hudson JB. (2012) Applications of the Phytomedicine *Echinacea purpurea* (Purple Coneflower) in Infectious Diseases. *J Biomed Biotechnol*, 769896.
- Hufnagel DA, Depas WH, Chapman MR. (2015) The Biology of the *Escherichia coli* Extracellular Matrix. *Microbiol Spectr* 3(3).
- Hussain A, Ewers C, Nandanwar N, Guenther S, Jadhav S y col. (2012) Multiresistant uropathogenic *Escherichia coli* from a region in India where urinary tract infections are endemic: genotypic and phenotypic characteristics of sequence type 131 isolates of the CTX-M-15 extended-spectrum-beta-lactamase-producing lineage. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 6358-6365.

- Jadhav S, Hussain A, Devi S, Kumar A, Parveen S y col. (2011) Virulence characteristics and genetic affinities of multiple drug resistant uropathogenic *Escherichia coli* from a semi urban locality in India. PLoS One 25, 6(3), e18063.
- Jami E, White BA, Mizrahi I. (2014) Potential role of the bovine rumen microbiome in modulating milk composition and feed efficiency. PLoS ONE 9(1), e85423.
- Jefferson KK. (2004) What drives bacteria to produce a biofilm? FEMS Microbiol Lett 236, 163-173.
- Jeon SJ, Cunha F, Vieira-Neto A, Bicalho RC, Lima S y col. (2017) Blood as a route of transmission of uterine pathogens from the gut to the uterus in cows. Microbiome 25, 5(1) 109.
- Jeon SJ, Galvão KN. (2018) An Advanced Understanding of Uterine Microbial Ecology Associated with Metritis in Dairy Cows. Genomics Inform 16(4), e21.
- Jeon SJ, Lima FS, Vieira-Neto A, Machado VS, Lima SF y col. (2018) Shift of uterine microbiota associated with antibiotic treatment and cure of metritis in dairy cows. Vet Microbiol 214, 132-139.
- Jeon SJ, Ma Z, Kang M, Galvão KN, Jeong KC. (2016) Application of chitosan microparticles for treatment of metritis and in vivo evaluation of broad spectrum antimicrobial activity in cow uteri. Biomaterials 110, 71-80.
- Jeon SJ, Oh M, Yeo WS, Galvão KN, Jeong KC. (2014) Shift of uterine microbiota associated with antibiotic treatment and cure of metritis in dairy cows. PLoS One 21;9(3), e92723.
- Jeon SJ, Vieira-Neto A, Gobikrushanth M, Daetz R, Mingoti RD y col. (2015) Uterine microbiota progression from calving until establishment of metritis in dairy cows. Appl Environ Microbiol 81, 6324-6332.
- Jeremejeva J, Orro T, Valdmann M, Kask K. (2010) Bacteriological and cytological findings during the late puerperal period after two different treatments of retained placenta followed by acute puerperal metritis. Acta Vet Scand 15, 52-41.
- Johnson JR, Johnston B, Clabots C, Kuskowski MA, Castanheira M. (2010). *Escherichia coli* sequence type ST131 as the major cause of serious multidrug-resistant E. coli infections in the United States. Clin Infect Dis 1;51(3), 286-94.
- Johnson JR, Owens K, Gajewski A, Kuskowski MA. (2005) Bacterial characteristics in relation to clinical source of *Escherichia coli* isolates from women with acute cystitis or pyelonephritis and uninfected women. J Clin Microbiol 43, 6064-6072.
- Johnson JR, Russo TA. (2002) Uropathogenic *Escherichia coli* as agents of diverse non-urinary tract extraintestinal infections. J Infect Dis 186, 859-864.
- Johnson JR, Russo TA. (2005) Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. Int J Med Microbiol 295, 383-404.
- Johnson JR, Stell AL. (2000) Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise. J Infect Dis 181(1), 261-272.
- Kachur K, Suntres ZE. (2015) The antimicrobial properties of ginseng and ginseng extracts. Expert Rev Anti Infect Ther 14(1), 81-94.
- Kaesbohrer A, Schroeter A, Tenhagen BA, Alt K, Guerra B y col. (2012) Emerging antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* with public health relevance. Zoonoses Public Health, 59(2), 158-165.
- Kano R, Kobayashi Y, Nishikawa A, Murata R, Ito T, Ito T, Suzuki K, Kamata H. (2018) Next-generation Sequencing Analysis of Bacterial Flora in Bovine Prototheca Mastitic Milk. Med Mycol J 59(3), 41-46.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol 2(2), 123-140.
- Karami N, Nowrouzian F, Adlerberth I, Wold AE. (2006) Tetracycline resistance in *Escherichia coli* and persistence in the infantile colonic microbiota. Antimicrob Agents Chemother. 50, 156-161.

- Karuppiah P, Rajaram S. (2012) Antibacterial effect of *Allium sativum* cloves and *Zingiber officinale* rhizomes against multiple-drug resistant clinical pathogens. *Asian Pac J Trop Biomed* 2(8), 597-601.
- Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE y col. (2004) Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology* 62,9-23.
- Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE y col. (2005). A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. *Can Vet J* 46(3), 255-259.
- Kassé FN, Fairbrother JM, Dubuc J. (2016) Relationship between *Escherichia coli* virulence factors and postpartum metritis in dairy cows. *J Dairy Sci* 99(6), 4656-4667.
- Kennedy PC, Miller RB. (1993) The female genital system. En: *Pathology of domestic animals*. 4th ed. Ed. Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N. pp, 378-387. Academic Press, San Diego, EE.UU.
- Klemm P, Schembri MA. (2004) Type 1 Fimbriae, Curli, and Antigen 43: Adhesion, Colonization, and Biofilm Formation. *EcoSal Plus* 1(1). doi: 10.1128/ecosalplus.8.3.2.6.
- Klijn, N, Weerkamp AH, de Vos WM. (1991) Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16S rRNA and specific DNA probes. *Appl Environ Microbiol* 57, 3390-3393.
- Knudsen LR, Karstrup CC, Pedersen HG, Angen Ø, Agerholm JS y col. (2016) An investigation of the microbiota in uterine flush samples and endometrial biopsies from dairy cows during the first 7 weeks postpartum. *Theriogenology* 15,86(2), 642-650.
- Köhler CD, Dobrindt U. (2011) What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? *Int J Med Microbiol* 301, 642-647.
- Kudinha T, Kong F, Johnson JR, Andrew SD, Anderson P y col. (2012) Multiplex PCR-based reverse line blot assay for simultaneous detection of 22 virulence genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 78(4), 1198-1202.
- Kumar A, Gupta HP, Prasad S. (2013) Studies on the immunomodulatory and therapeutic efficacy of neem (*Azadirachta indica*) on endometritis in repeat breeding crossbred cows. *Indian J Anim Reprod* 34(2), 1-5.
- Kumar A, Singh U. (2009) Fertility status of Haryana cows. *Indian Vet J* 86, 807-809.
- Laguardia-Nascimento MKM, Branco MR, Gasparini S, Giannattasio-Ferraz LR, Leite FM y col. (2015) Vaginal microbiome characterization of Nellore cattle using metagenomic analysis. *PLoS One* 10, e0143294.
- Landers TF, Cohen B, Wittum TE, Larson EL. (2012) A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. *Public Health Rep* 127(1), 4-22.
- Laven R, Chambers P, Stafford K. (2012) Using non-steroidal anti-inflammatory drugs around calving: Maximizing comfort, productivity and fertility. *Vet J* 192, 8-12.
- Le Bouguenec C, Servin AL. (2006) Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens. *FEMS Microbiol Lett* 256, 185-194.
- Le Chatelier E, Nielsen T, Qi, Prifti E, Hildebrand F y col. (2013) Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 500,541-546.
- LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, Bateman KG, Keefe GP y col. (2002) Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *J DairySci* 85, 2223-2236.
- LeBlanc SJ. (2008) Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: a review. *Vet J* 176, 102e14.
- Leid JG, Ditto AJ, Knapp A, Shah PN, Wright BD y col. (2012) In vitro antimicrobial studies of silver carbene complexes: Activity of free and nanoparticle carbene formulations against clinical isolates of pathogenic bacteria. *J Antimicrob Chemother* 67, 138-148.

- Lewis FM, Bernstein KT, Aral SO. (2017) Vaginal Microbiome and Its Relationship to Behavior, Sexual Health, and Sexually Transmitted Diseases *Obstet Gynecol* 2129(4), 643-654.
- Lindsay D, von Holy A. (2008) Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *J Hosp Infect* 64, 313-325.
- Locatelli C, Scaccabarozzi L, Pisoni G, Bronzo V, Casula A y col. (2013) *Helcococcus kunzii* and *Helcococcus ovis* isolated in dairy cows with puerperal metritis. *J Gen Appl Microbiol* 59, 371-374.
- Lorenzen E, Kudirkiene E, Gutman N, Grossi A.B, Agerholm JS y col. (2015) The vaginal microbiome is stable in prepubertal and sexually mature Ellegaard Göttingen Minipigs throughout an estrous cycle. *Vet Res* 28, 46-125.
- Ma Q, Wood TK. (2009) OmpA influences *Escherichia coli* biofilm formation by repressing cellulose production through the CpxRA two-component system. *Environ Microbiol* 11(10), 2735-2746.
- Machado VS, Bicalho ML, Meira Junior EB, Rossi R, Ribeiro BL y col. (2014) Subcutaneous immunization with inactivated bacterial components and purified protein of *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum* and *Trueperella pyogenes* prevents puerperal metritis in Holstein dairy cows. *PLoS One* 17,9(3), e91734.
- Machado VS, Oikonomou G, Bicalho MLS, Knauer WA, Gilbert R y col. (2012) Investigation of postpartum dairy cows' uterine microbial diversity using metagenomic pyrosequencing of the 16S rRNA gene. *Vet Microbiol* 159, 460-469.
- Magata F, Horiuchi M, Miyamoto A, Shimizu T. (2014) Lipopolysaccharide (LPS) inhibits steroid production in theca cells of bovine follicles in vitro: distinct effect of LPS on theca cell function in pre- and post-selection follicles. *J Reprod Dev* 60(4), 280-287.
- Magiorakos JAP, Srinivasan A, Carey ARB, Carmeli Y, Falagas YME y col. (2012) Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance, *Clin Microbiol Infect* 18, 268-281.
- Maquivar MG, Barragan AA, Velez JS, Bothe H, Schuenemann GM. (2015) Effect of intrauterine dextrose on reproductive performance of lactating dairy cows diagnosed with purulent vaginal discharge under certified organic management. *J Dairy Sci* 98(6), 3876-3886.
- Mahboubi M, Feizabadi MM, Safara M. (2006) Antifungal activity of essential oils from *Zataria multiflora*, *Rosmarinus officinalis*, *Lavandula stoechas*, *Artemisia sieberi* and *Pelargonium graveolans* against clinical isolates of *Candida albicans*. *Pharmacognosy Magazine* 4, 15-18.
- Malik T, Singh P. (2010) Antimicrobial Effects of Essential Oils against Uropathogens with Varying Sensitivity to Antibiotics. *Asian J Biol Sci* 3, 92-98.
- Malinowski E, Lassa H, Markiewicz H, Kaptur M, Nadolny M y col. (2011) Sensitivity to antibiotics of *Arcanobacterium pyogenes* and *Escherichia coli* from the uteri of cows with metritis/endometritis. *Vet J* 187(2), 234-238.
- Mandhwani R, Bhardwaz A, Kumar S, Shivhare M, Aich R. (2017) Insights into bovine endometritis with special reference to phytotherapy. *Vet World* 10(12), 1529-1532.
- Mann S, Siler JD, Jordan D, Warnick LD. (2011) Antimicrobial susceptibility of fecal *Escherichia coli* isolates in dairy cows following systemic treatment with ceftiofur or penicillin. *Foodborne Pathog Dis* 8, 861-867.
- Mathew A, Taranalli AD, Torgal SS. (2004) Evaluation of Anti-inflammatory and Wound Healing Activity of *Gentiana lutea* Rhizome Extracts in Animals. *Pharm Biol* 42(1), 8-12.
- Maurer JJ, Brown TP, Steffens WL, Thayer SG. (1998) The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin tsh among avian *Escherichia coli*. *Avian Dis* 42, 106-118.

- Mazurek J, Pusz P, Bok E, Stosik M, Baldy-Chudzik K (2013). The phenotypic and genotypic characteristics of antibiotic resistance in *Escherichia coli* populations isolated from farm animals with different exposure to antimicrobial agents. *Pol J Microbiol* 62(2), 173-179.
- McDonald D, Price MN, Goodrich J, Nawrocki EP, DeSantis TZ y col. (2012) An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J* 6, 610-618.
- McDougall S, Hussein H, Aberdein D, Buckle K, Roche J, y col. (2011) Relationships between cytology, bacteriology and vaginal discharge scores and reproductive performance in dairy cattle. *Theriogenology*,76(2), 229-40.
- Michael GB, Kaspar H, Siqueira AK, de Freitas Costa E, Corbellini LG y col. (2017) Extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolates collected from diseased food-producing animals in the GERM-Vet monitoring program 2008-2014. *Vet Microbiol* 200, 142-150.
- Miller AN, Williams EJ, Sibley K, Herath S, Lane EA y col. (2007) The effects of *Arcanobacterium pyogenes* on endometrial function in vitro, and on uterine and ovarian function in vivo. *Theriogenology* 68(7), 972-980.
- Miraj S, Alesaeidi S. (2016) A systematic review study of therapeutic effects of *Matricaria recuitta chamomile* (chamomile). *Electron Physician* 20;8(9), 3024-3031.
- Mirzaee F, Hosseini A, Jouybari HB, Davoodi A, Azadbakht M. (2017) Medicinal, biological and phytochemical properties of *Gentiana* species *J Tradit Complement Med* 7(4),400-408.
- Moreno E, Johnson JR, Pérez T, Prats G, Kuskowski MA y col. (2009) Structure and urovirulence characteristics of the fecal *Escherichia coli* population among healthy women. *Microbes Infect* 11(2), 274-280.
- Moreno E, Planells I, Prats G, Planes AM, Moreno G y col. (2005) Comparative study of *Escherichia coli* virulence determinants in strains causing urinary tract bacteremia versus strains causing pyelonephritis and other sources of bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 53(2), 93-99.
- Mosquito S, Ruiz J, Bauer JL, Ochoa TJ (2011) Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 28(4), 648-656.
- Moulin-Schouleur M, Répérant M, Laurent S, Brée A, Mignon-Grasteau S y col. (2007) Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *J Clin Microbiol* 45, 3366-3376.
- Moussaoui F, Tajelmolk A. (2016) Evaluation of antibacterial activity and synergistic effect between antibiotic and the essential oils of some medicinal plants. *Asian Pac J Trop Biomed* 6 (1), 32-37.
- Munir N, Iqbal AS, Altaf I, Bashir R, Sharif N y col. (2014) Evaluation of antioxidant and antimicrobial potential of two endangered plant species atropa belladonna and *Matricaria chamomilla*. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 11, 111-117.
- Murthy A, Phan MD, Peters KM, Nhu NTK, Welch RA y col. (2018) Regulation of hemolysin in uropathogenic *Escherichia coli* fine-tunes killing of human macrophages. *Virulence*. 31, 9(1), 967-980.
- Murugavel K, Yaniz JL, Santolaria P, Lopez-Bejar M, Lopez-Gatius F. (2003) Luteal activity at the onset of a timed insemination protocol affects reproductive outcome in early postpartum dairy cows. *Theriogenology* 60, 583-593.
- Nadaroglu H, Adiguzel A, Adiguzel G. (2015) Purification and characterization of b -mannanase from *Lactobacillus plantarum* (M24) and its applications in some fruit. *Int J Food Sci Technol* 50(5), 1158-1165.
- Nader-Macias ME, Otero MC. (2009) Lactic Acid Bacteria as probiotic on the prevention of reproductive diseases. En: *Probiotics: Production, Evaluation and Uses in Animal Feed*, Ed. Guerra NP, Castro LP. pp, 119- 174. Research Signpost, Kerala, India.

- Nandanwar N, Janssen T, Kühl M, Ahmed N, Ewers C y col. (2014) Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) of human and avian origin belonging to sequence type complex 95 (STC95) portray indistinguishable virulence features. *Int J Med Microbiol* 304(7), 835-842.
- Nelson DB, Hanlon AL, Wu G, Liu C, Fredricks DN. (2015) First trimester levels of BV-associated bacteria and risk of miscarriage among women early in pregnancy. *Matern Child Health J* 19, 2682-2687.
- Newby NC, Leslie KE, Dingwell HDP, Kelton DF, Weary DM y col. (2017) The effects of periparturient administration of flunixin meglumine on the health and production of dairy cattle. *J Dairy Sci* 100(1), 582-587.
- Nicolaus C, Junghanns S, Hartmann A, Murillo R, Ganzera M. (2017) In vitro studies to evaluate the wound healing properties of *Calendula officinalis* extracts. *J Ethnopharmacol* 196, 94-103.
- Nowicki B, Selvarangan R, Nowicki S. (2001) Family of *Escherichia coli* Dr adhesins: decay-accelerating factor receptor recognition and invasiveness. *J Infect Dis* 183(1), 24-27.
- Olive DM, Bean P. (1999) Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 37(6), 1661-1669.
- Organización Mundial de la Salud (OMS) ha calificado este fenómeno de “amenaza global” (WHO Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. (2015) http://www.who.int/drugresistance/global_action_plan/
- Otero C, Saavedra L, Silva de Ruiz C, Wilde O, Holgado AR y col. (2000) Vaginal bacterial microflora modifications during the growth of healthy cows. *Lett Appl Microbiol* 31, 251-254.
- Otero C, Silva de Ruiz C, Ibaez R, Wilde OR, de Ruiz Holgado AAP y col. (1999) Lactobacilli and enterococci isolated from the bovine vagina during the estrous cycle. *Anaerobe* 5, 305-307.
- Otero MC, Morelli L, Nader-Macias ME. (2006) Probiotic properties of vaginal lactic acid bacteria to prevent metritis in cattle. *Lett Appl Microbiol* 43, 91-97.
- Otero MC, Espeche MC, Nader-Macias ME. (2007) Optimization of the freeze-drying media and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* for veterinarian probiotic applications *Process Biochemistry* 42(10), 1406-1411.
- Otero MC, Nader-Macias ME. (2006) Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H202 - producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the bovine vaginal tract. *Anim Reprod Sci* 96, 35-47.
- Ozawa T, Kiku T, Mizuno M, Inumaru S, Kushibiki S y col. (2012) Effect of intramammary infusion of rbGM-CSF on SCC and expression of polymorphonuclear neutrophil adhesion molecules in subclinical mastitis cows. *Vet Res Commun* 36, 21-27.
- Ozougwu J, Eyo J. (2014) Hepatoprotective effects of *Allium cepa* (onion) extracts against paracetamol-induced liver damage in rats. *African J Biotechnology* 13(26), 2679-2688.
- Padula AM, Macmillan KL. (2006). Effect of treatment with two intravaginal inserts on the uterine and vaginal microflora of early postpartum beef cows. *Aust Vet J*, 84, 204-208.
- Palanisamy JK, Ponnu S, Mani S, Balakrishnan S. (2018) A critical review on traditional herbal drugs: an emerging alternative drug for varicose veins. *World J Pharm Res* 7(5), 316-338.
- Palmer C. (2007) Metritis posparto en vacas lecheras. *Taurus* 9 (36), 20-37.
- Pang M, Xie X, Bao H, Sun L, He T y col. (2018) Insights into the bovine milk microbiota in dairy farms With Different Incidence Rates of Subclinical Mastitis. *Front Microbiol* 9, 2379.
- Pascottini OB, Hostens M, Dini P, Van Eetvelde M, Vercauteren P, Opsomer G. (2016a) Prevalence of cytological endometritis and effect on pregnancy outcomes at the time of insemination in nulliparous dairy heifers. *J Dairy Sci* 99, 9051e6.
- Pascottini OB, Hostens M, Dini P, Vandepitte J, Ducatelle R, Opsomer G. (2016b) Comparison between cytology and histopathology to evaluate subclinical endometritis in dairy cows. *Theriogenology* 86, 1550e6.

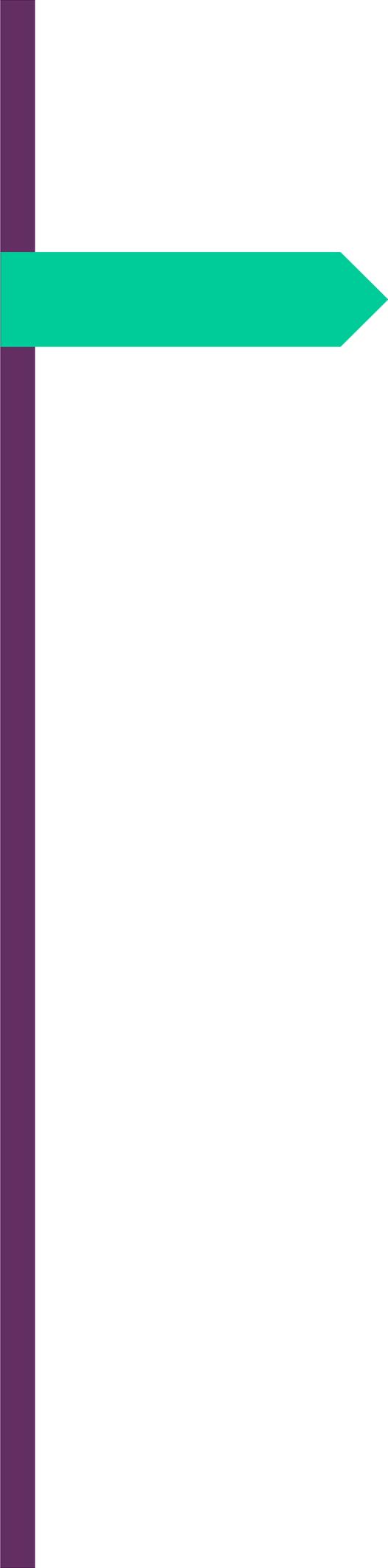
- Penna B, Libonati H, Director A, Sarzedas AC, Martins G y col. (2013) Progesterin-impregnated intravaginal sponges for estrus induction and synchronization influences on goats vaginal flora and antimicrobial susceptibility. *Anim Reprod Sci* 142, 71-74.
- Pérez-Marín CC y España F. (2007) Oestrus Expression and Ovarian Function in Repeat Breeder Cows, Monitored by Ultrasonography and Progesterone Assay. *Reprod Dom Anim* 42, 449-456.
- Pérez-Marín CC, Molina Moreno L, Vizquete Calero G. (2012) Clinical Approach to the Repeat Breeder Cow Syndrome. En: *A Bird's-Eye View of Veterinary Medicine*. Ed. Perez-Marín CC. pp. 337-362. Tech Open. doi: 10.5772/31374.
- Picard B, Sevali García J, Gouriou S, Duriez P, Brahim N y col. (1999) The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extra-intestinal infection. *Infect Immun* 67, 546-553.
- Pinedo PJ, Velez JS, Bothe H, Merchan D, Pineiro JM y col. (2015) Effect of intrauterine infusion of an organic-certified product on uterine health, survival, and fertility of dairy cows with toxic puerperal metritis. *J Dairy Sci* 98, 3120-3132.
- Pohl A, Bertulat S, Borchardt S, Burfeind O, Heuwieser W. (2016) Randomized, controlled clinical trial on the efficacy of nonsteroidal antiinflammatory drugs for the treatment of acute puerperal metritis in dairy cows. *J Dairy Sci* 99(10), 8241-8249.
- Ponti D. (2011) Canales de Comercialización de carne vacuna en mercado interno. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Dirección de Análisis Económico Pecuario-Dirección Nacional de Transformación y Comercialización de Productos Pecuarios. <http://www.produccion-animal.com.ar>.
- Pompilio A, Crocetta V, Savini V, Petrelli D, Di Nicola M y col. (2018). Phylogenetic relationships, biofilm formation, motility, antibiotic resistance and extended virulence genotypes among *Escherichia coli* strains from women with community-onset primitive acute pyelonephritis. *PLoS One* 14;13(5), e0196260.
- Popova A, Mihaylova D. (2014) In vitro antioxidant and antimicrobial activity of extracts of bulgarian *Malva sylvestris* L. Conference: First National Conference of Biotechnology, At Sofia, Volume: 100.
- Preziuso S, Marenzoni ML, Thiry J, Thiry E, Cuteri V. (2018) Molecular characterization and virulence of an alpha-herpesvirus isolated from a BoHV1 gB-seropositive and gE-seronegative Italian buffalo. *Vet Microbiol.* 221, 27-32.
- Prince AL, Ma J, Kannan PS, Alvarez M, Gisslen T y col. (2016) The placental microbiome is altered among subjects with spontaneous preterm birth with and without chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol* 214, 627.e1-627.
- Raso M. (2012) Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (I.A.T.F) *Ganaderia* 46, 203-206.
- Reppert, E. J. (2015). Evidence for the Use of Ceftiofur for Treatment of Metritis in Dairy Cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 31(1), 139-149.
- Restieri C, Garriss G, Locas MC, Dozois CM. (2007) Autotransporter-encoding sequences are phylogenetically distributed among *Escherichia coli* clinical isolates and reference strains. *J Appl Environ Microbiol* 73(5), 1553-1562.
- Revista Super Campo. (2018). <http://supercampo.perfil.com/2018/03/carne-vacuna-aumentaron-la-produccion-y-el-consumo-interno-en-febrero/>
- Rhodes FM, Mcdougall S, Burke CR, Verkerk GA, Macmillan KL. (2003) Invited Review: Treatment of Cows with an Extended Postpartum Anestrous Interval. *J Dairy Sci* 86, 1876-1894.
- Ricci A, Gallo S, Molinaro F, Dondo A, Zoppi S y col. (2015) Evaluation of SEM and consequences on fertility in piedmontese beef cows. *Reprod Domest Anim* 50(1), 142e8.
- Ricci A, Bonizzi G, Sarasso G, Gallo S, Dondo A y col. (2017) Subclinical endometritis in beef cattle in early and late postpartum: Cytology, bacteriology, haptoglobin and test strip efficiency to evaluate the evolution of the disease. *Theriogenology* 94, 86-93.

- Richards BD, Black DH, Christley RM, Royal MD, Smith RF y col. (2009) Effects of the administration of ketoprofen at parturition on the milk yield and fertility of Holstein Friesian cattle. *Vet Rec* 165, 102-106.
- Romero R, Hassan SS, Gajer P, Tarca AL, Fadrosh DW y col. (2014) The composition and stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of non-pregnant women. *Microbiome* 2, 4.
- Römling U, Bian Z, Hammar M, Sierralta WD, Normark S. (1998) Curli fibers are highly conserved between *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation. *J Bacteriol* 180,722-731.
- Ryu JH, Kim H, Frank JF, Beuchat LR. (2004) Attachment and biofilm formation on stainless steel by *Escherichia coli* O157:H7 as affected by curli production. *Lett Appl Microbiol* 39(4), 359-362.
- Sakoulas G. (2002) Accessory gene regulator (*agr*) locus in geographically diverse *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 1492-1502.
- Sánchez C, Suero M, Castignano H, Terán J, Marino M. (2012). La lechería argentina: estado actual y su evolución (2008 a 2011) Web: <http://inta.gob.ar/documentos/la-lecheria-argentina-estado-actual-y-su-evolucion-2008-a-2011/>
- Sánchez M. (2004) Estudio de tendencias sobre el uso de medicina natural en la salud animal. Consultoría biomundi. IDICT, Instituto de Información Científica y Tecnológica de Cuba.
- Sanders JW, Martin JW, Hooke M y col. (2000) *Methylobacterium mesophilicum* infection: case report and literature review of an unusual opportunistic pathogen. *Clin Infect Dis* 30(6), 936-938.
- Sannes MR, Kuskowski MA, Owens K. (2004) Virulence factor profiles and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from veterans with bacteremia and uninfected control subjects. *J Infect Dis* 190, 2121-2128.
- Santos NR, Lamb GC, Brown DR, Gilbert RO. (2009) Postpartum endometrial cytology in beef cows. *Theriogenology* 71, 739e45.
- Santos TM, Gilbert RO, Bicalho RC. (2011) Metagenomic analysis of the uterine bacterial microbiota in healthy and metritic postpartum dairy cows. *J Dairy Sci* 94, 291-302.
- Santos TM, Gilbert RO, Caixeta LS, Machado VS, Teixeira LM y col. (2010) Susceptibility of *Escherichia coli* isolated from uteri of postpartum dairy cows to antibiotic and environmental bacteriophages. Part II: In vitro antimicrobial activity evaluation of a bacteriophage cocktail and several antibiotics. *J Dairy Sci* 93, 105-114.
- Santos TMA, Bicalho RC. (2012) Diversity and succession of bacterial communities in the uterine fluid of postpartum metritic, endometritic and healthy dairy cows. *PLoS ONE* 7, e53048.
- Sarkar P, Kumar H, Rawat M, Varshney VP, Goswami TK y col. (2006) Effect of administration of garlic extract and PGF₂α on hormonal changes and recovery in endometritis cows. *Asian Aus J Anim* 19(7), 964-969.
- Šavikin K, Menković N, Zdunić G, Stević T, Radanović D. (2009) Antimicrobial Activity of *Gentiana lutea* L. Extracts *Z Naturforsch C* 64(5-6), 339-342.
- Schembri MA, Sokurenko EV, Klemm P. (2000) Functional Flexibility of the *fimh* Adhesin: Insights from a Random Mutant Library. *Infect Immun* 68(5), 2638-2646.
- Schmidt B, Mulder IE, Musk CC, Aminov RI, Lewis M y col. (2011) Establishment of normal gut microbiota is compromised under excessive hygiene conditions. *PLoS One* 6 e28284.
- Seidán F. (2018) tambos en Tucumán: si hay crisis que no se note. Producción agroindustrial del NOA. año 29 - número 229 - Mayo / Junio 2018. p 28-30.
- Sekhar MS, Sharif NM, Rao TS, Metta M. (2017) Genotyping of virulent *Escherichia coli* obtained from poultry and poultry farm workers using enterobacterial repetitive intergeneric consensus-polymerase chain reaction, *Veterinary World* 10(11), 1292-1296.

- Shannon CE. (1997) The mathematical theory of communication. 1963. MD Comput 14, 306–317.
- Sharifi-Rad M, Nazaruk J, Polito L, Morais-Braga MFB, Rocha JE y col. (2018) *Matricaria* genus as a source of antimicrobial agents: From farm to pharmacy and food applications. Microbiol Res 215, 76-88.
-
- Sheldon IM, Bushnell M, Montgomery J, Rycroft AN. (2004b) Minimum inhibitory concentrations of some antimicrobial drugs against bacteria causing uterine infections in cattle. Veterinary Record 155, 383-387.
- Sheldon IM, Cronin J, Goetze L, Donofrio G, Schuberth HJ. (2009) Defining Postpartum Uterine Disease and the Mechanisms of Infection and Immunity in the Female Reproductive Tract in Cattle. Biology of Reproduction 81, 1025-1032.
- Sheldon IM, Dobson H. (2004) Postpartum uterine health in cattle. Anim Reprod Sci 82-83, 295-306.
- Sheldon IM, Lewis GS, LeBlanc S, Gilbert RO. (2006) Defining postpartum uterine disease in cattle. Theriogenology 65, 1516-1530.
- Sheldon IM, Noakes DE, Rycroft AN, Pfeiffer D, Dobson H. (2002) Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. Reproduction 123, 837-845.
- Sheldon IM, Rycroft AN, Dogan B, Craven M, Bromfield JJ y col. (2010) Specific strains of *Escherichia coli* are pathogenic for the endometrium of cattle and cause pelvic inflammatory disease in cattle and mice. PLoS ONE 5, e9192.
- Sheldon IM, Rycroft AN, Zhou C. (2004a) Association between postpartum pyrexia and uterine bacterial infection in dairy cattle. Vet Rec 154, 289-293.
- Shpigel NY, Elazar S, Rosenshine I. (2008) Mammary pathogenic *Escherichia coli*. Curr Opin Microbiol 11(1), 60-65.
- Sicsic R, Goshen T, Dutta R, Kedem-Vaanunu N, Kaplan-Shabtai V y col. (2018) Microbial communities and inflammatory response in the endometrium differ between normal and metritic dairy cows at 5-10 days post-partum. Vet Res 49, 77.
- Silva E, Leitao S, Tenreiro T, Pomba C, Nunes T. (2009) Genomic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates recovered from the uterus of puerperal dairy cows. J Dairy Sci 92, 6000-6010.
- Simon C, Danie R. (2011) Metagenomic Analyses: Past and Future Trends. Appl Environ Microbiol 77(4), 1153-1161.
- Skenandore CS, Velasco Acosta DA, Zhou Z, Rivelli MI, Corrêa MN y col. (2017) Effects of rumen-protected methionine and choline supplementation on vaginal discharge and uterine cytology of Holstein cows. Int J Vet Sci Med 12:5(1), 1-7.
- Smith JL, Fratamico PM, Gunther NW. (2007) Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. Foodborne Pathog Dis 4, 134-163.
- Soltani M, Peighambari SM, Askari Badouei M, Sadrzadeh A. (2012) Molecular typing of avian *Escherichia coli* isolates by enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences-polymerase chain reaction (ERIC-PCR). Iran J Vet Med 6(3), 143-148.
- Stanojevic LP, Marjanovic-Balaban ZR, Kalaba VD, Stanojevic JS, Cvetkovic DJ. (2016) Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Chamomile Flowers Essential Oil (*Matricaria chamomilla* L.) J Essent Oil Bear Pl 19(8), 2017-2028.
- Stock AE, Fortune JE. (1993) Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. Endocrinology 132, 1108-1114.
- Tardugno R, Pellati F, Iseppi R, Bondi M, Bruzzesi G y col. (2018) Phytochemical composition and in vitro screening of the antimicrobial activity of essential oils on oral pathogenic bacteria. Nat Prod Res 32(5), 544-551.

- Tegos G, Stermitz FR, Lomovskaya O, Lewis K. (2002) Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 3133–3141.
- Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. (2010) The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 8, 207–217.
- Teuber M, Perreten V, Wirsching F. (1996). Antibiotikumresistente bakterien: eine neue dimension in der lebensmittelmikrobiologie. *Lebensmittel- Technologie*, 29: 182-199.
- Todar K. (2008). <http://textbookofbacteriology.net/e.coli.html> USA.
- Toussaint KA, Gallagher JC. (2015) β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations: From then to now. *Ann Pharmacother* 49, 86–98.
- Van Gerven N, Klein RD, Hultgren SJ, Remaut H. (2015) Bacterial amyloid formation: structural insights into curli biogenesis. *Trends Microbiol* 23(11), 693-706.
- Vega JA. (2004) Los Costos Agropecuarios. Tema III. Conferencia (postgrado), ICA. La Habana. Cuba.
- Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 19(24), 6823-6831.
- Vila J, Sáez-López E, Johnson JR, Römling U, Dobrindt U y col. (2016) *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. *FEMS Microbiol Rev* 1;40(4), 437-463.
- Vitali B, Cruciani F, Baldassarre M.E, Capursi T, Spisni E y col. (2012) Dietary supplementation with probiotics during late pregnancy: outcome on vaginal microbiota and cytokine secretion. *BMC Microbiol* 18, 12-236.
- von Mering C, Hugenholtz P, Raes J, Tringe SG, Doerks T y col. (2007) Quantitative phylogenetic assessment of microbial communities in diverse environments. *Science* 315, 1126–1130.
- Wagener K, Drillich M, Baumgardt S, K€ampfer P, Busse HJ y col. (2014) *Falsiporphyrromonas endometrii* gen. nov., sp. nov., isolated from the postpartum bovine uterus, and emended description of the genus *Porphyromonas* Shah and Collins 1988. *Int J Syst Evol Microbiol* 64, 642–649.
- Walsh RB, LeBlanc SJ, Duffield TF, Kelton DF, Walton JS, y col. (2007) The effect of a progesterone releasing intravaginal device (PRID) on pregnancy risk to fixed-time insemination following diagnosis of non-pregnancy in dairy cows. *Theriogenology* 67, 948–956.
- Walsh RB, LeBlanc SJ, Vernooy E, Leslie KE. (2008) Safety of a progesterone-releasing intravaginal device as assessed from vaginal mucosal integrity and indicators of systemic inflammation in postpartum dairy cows. *Can J Vet Res* 72, 43-49.
- Wang J, Sun C, Liu C, Yang Y, Lu W. (2016) Comparison of vaginal microbial community structure in healthy and endometritis dairy cows by PCR-DGGE and real-time PCR. *Anaerobe* 38, 1–6.
- Wang X, Yan Q, Xia X, Zhang Y, Li D y col. (2013) Serotypes, virulence factors, and antimicrobial susceptibilities of vaginal and fecal isolates of *Escherichia coli* from giant pandas. *Appl Environ Microbiol* 79(17), 5146-5150.
- Welch RA. (2016) Uropathogenic *Escherichia coli*-Associated Exotoxins. *Microbiol Spectr* 4(3).
- Whiteside SA, Razvi H, Dave S, Reid G, Burton JP. (2015) The microbiome of the urinary tract – a role beyond infection. *Nat Rev Urol.* 12(2), 81-90.
- Williams EJ, Fischer DP, Noakes DE, England GCW, Rycroft A y col. (2007) The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. *Theriogenology* 68, 549–559.
- Williams EJ, Fischer DP, Pfeiffer DU, England GCW, Noakes DE y col. (2005) Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology* 63, 102–117.

- Wroblewska-Seniuk K, Selvarangan R, Hart A, Pladzyk R, Goluszko P y col. (2005) Dra/AfaE adhesin of uropathogenic Dr/Afa+ *Escherichia coli* mediates mortality in pregnant rats. *Infect Immun.* 73(11), 7597-601.
- Wu S, Baldwin RL, Li W, Li C, Connor EE y col. (2012) The Bacterial Community Composition of the Bovine Rumen Detected Using Pyrosequencing of 16S rRNA Genes. *Metagenomics* 1,11.
- Wullt B, Bergsten G, Samuelsson M, Svanborg C. (2002) The role of P fimbriae for *Escherichia coli* establishment and mucosal inflammation in the human urinary. *Int J Antimicrob Agents* 19(6), 522-538.
- Yap PSX, Yiap BC, Ping HC, Lim SHE. (2014) Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. *Open Microbiol J* 8, 6-14.
- Yu F, Tang YT, Hu ZQ, Lin XN. (2018) Analysis of the Vaginal Microecological Status and Genital Tract Infection Characteristics of 751 Pregnant Women. *Med Sci Monit* 1,24, 5338-5345.
- Zambrano AC. (2006). Principales factores que afectan la prolificidad del ganado vacuno en Latinoamérica. *Redvet* 7(10), 1-11.



ANEXO

Méd. Vet. Candelaria Gonzalez Moreno

ANEXO

MEDIOS DE CULTIVOS. COMPOSICIÓN Y PREPARACIÓN

-Agar Luria Bertani sin NaCl (LB sin NaCl)

Composición: cada 100 mL de agua destilada lleva 1 g de triptona, 0,5 g de extracto de levadura, 1% de agar, pH = $7 \pm 0,2$.

Preparación: se pesa 1 g de triptona, 0,5 g de extracto de levadura, 1,5 g de agar y se disuelven en 100 mL de agua destilada, se calienta hasta disolución total y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min. Luego se coloca en tubos de ensayo estériles.

- **Agar Mac Conkey** (Laboratorios Britania). Este medio se utiliza para el aislamiento de bacilos Gram negativos de fácil desarrollo, aeróbico y facultativos. Permite diferenciar bacterias que utilizan o no lactosa, en muestras clínicas, de agua y alimentos. Todas las especies de la familia *Enterobacteriaceae* desarrollan en el mismo.

Preparación: pesar 50 g y diluir en 1 L, dejar reposar 5 min, mezclar y calentar a temperatura de ebullición 1 a 2 min hasta disolución total. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

Composición: sales biliares (impiden el desarrollo de bacterias Gram positivas, excepto *Enterococcus* y algunas especies de *Staphylococcus*), cristal violeta (inhibe cierto tipo de bacterias Gram positivas), colorante rojo neutro (confiere color a las colonias de microorganismos que fermentan la lactosa), lactosa, peptona y NaCl.

Agar Sangre: composición en g/L: pluriptona, 5; extracto de carne (Laboratorios Britania), 3; sangre entera anticoagulada 5%; agar, 15.

Agar Muller Hinton

Composición: en g/L: 300 g de infusión de carne, 17,50 g de peptona ácida de caseína, 1,50 g de almidón, 15 g de agar y pH = $7,3 \pm 0,1$ a 25 °C.

Preparación: se pesan 37 g y se disuelven en 100 mL de agua destilada. Se deja embeber de 10 a 15 minutos, y luego se calienta con agitación frecuente hasta disolución total y se lleva a hervir durante 1 minuto. Por último se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min, se deja enfriar a 45 - 50 °C. Luego se distribuye en placas de petri hasta un nivel de 4 mm sobre una superficie horizontal (25 mL aproximadamente en placas de 9 cm).

-**BHI** (Laboratorios Britania): composición en g/L: infusión de cerebro de ternera 200, infusión de corazón vacuno 250, peptona 10, NaCl 5, glucosa 2, fosfato disódico 2,5.

-Caldo Luria Bertani sin NaCl (LB sin NaCl)

Composición: cada 100 mL de agua destilada lleva 1 g de triptona, 0,5 g de extracto de levadura, pH = $7 \pm 0,2$.

Preparación: se pesa 1 g de triptona, 0,5 g de extracto de levadura y se disuelven en 100 mL de agua destilada, se calienta hasta disolución total y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min. Luego se coloca 2 mL en tubos de Khan estériles.

-Caldo nutritivo (Laboratorios Britania): es un medio apto para el desarrollo de microorganismos de escasos requerimientos nutricionales.

Preparación: se pesa 8 g y se disuelve en 1 L de agua destilada. Se calienta hasta disolver y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min.

Composición en g/L: pluripeptona 5, extracto de carne 3.

-Citrato de Simmons

Composición: en g/L: citrato de sodio 2 g, MgSO₄ 0,2 g, NaCl 5 g, NH₄H₂PO₄ 1 g, K₂HPO₄ 1 g, azul de bromo timol 0,08 g y agar 15 g. El indicador presenta color amarillo a pH = 6,1 y azul a pH = 7,7.

Preparación: se pesan 24,2 g y se disuelve en 1 L de agua destilada, se deja reposar 5 min, se mezcla y se calienta a ebullición durante 1 a 2 min hasta disolución total, el pH final se ajusta en 6,9 y resulta un medio de color verde. Por último se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min. Luego se colocan 1,5 mL en tubos de Khan estériles y se dejan enfriar inclinados de manera que el medio solidifique en forma de bisel.

-Fenilalanina Desaminasa

Composición: en g/L: 3 g de extracto de levadura, 2 g de DL- fenilalanina, 1 g de fosfato disódico, 5 g de cloruro de sodio, 12 g de agar, pH final 7,3 ± 0,2. Se utiliza como revelador tricloruro férrico al 10%.

Preparación: Se pesan 23 g y se disuelven en 1 L de agua destilada, se deja reposar 5 minutos, se mezcla y se calienta a ebullición 1 a 2 minutos hasta disolución total. Por último, se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min. Luego se colocan 1,5 mL en tubos de Khan estériles y se dejan enfriar inclinados de manera que el medio solidifique en forma de bisel.

-LIA (Lisina Hierro Agar)

Composición: en g/L: 5 g de peptona de gelatina, 3 g de extracto de levadura, 1 g de glucosa, 10 g de lisina, 0,5 g de citrato de hierro y amonio, 0,04 g de tiosulfato de amonio, 0,02 g de púrpura de bromo cresol, 15 g de agar, pH final 6,7 ± 0,2.

Preparación: Se pesan 35 g y se disuelve en 1 L de agua destilada, se calienta hasta disolución total y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min. Luego se colocan 1,5 mL en tubos de Khan estériles y se dejan enfriar inclinados de manera que el medio solidifique en forma de bisel.

-PBS en inglés: phosphate buffered saline

Composición: cada 100 mL de agua destilada lleva 0,75 g de fosfato dibásico, 0,04 g de fosfato monobásico, 0,72 g de NaCl, pH = 7.

Preparación: se pesa 0,75 g de fosfato dibásico, 0,04 de fosfato monobásico, 0,72 g de NaCl y se disuelven en 100 mL de agua destilada. Por último se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min.

-Rojo de Metilo - Voges Proskauer

Composición: en g/L: 7 g de peptona, 5 g de K₂HPO₄ y 5 g de glucosa.

Preparación: se pesan 17 g y se disuelven en 1 L de agua destilada, se calienta hasta disolución total y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min. Luego se colocan 2 mL en tubos de Khan estériles. El indicador rojo de metilo es amarillo a pH 6,0 y rojo a pH 4,4.

-SIM (Sulfuro de hidrogeno Indol Movilidad)

Composición: en g/L: 20 g de tripteína, 6,1 g de peptona, 0,2 g de sulfato de hierro y amonio, 0,2 g de tiosulfato de sodio, 3,5 g de agar y pH final $7,3 \pm 0,2$.

Preparación: se pesa 30 g y se disuelven en 1 L de agua destilada, se calienta hasta disolución total y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min. Luego se colocan 1,5 mL en tubos de Khan estériles y se deja enfriar hasta que el medio solidifique.

-T.S.I. (Triple Sugar Iron) (Laboratorios Britania)

Composición: glucosa 0,1 g%, lactosa 1 g%, sacarosa 1 g%, peptona 2%, NaCl 0,5%, sulfato doble de hierro y amonio 0,02%, tiosulfato de sodio 0,02%, agar 1% y como indicador de pH rojo fenol en concentración final de 2,5 mg% (rojo a pH = 8,5 y amarillo a pH = 6,9).

Preparación: se pesan 62,5 g y se agrega 1 L de agua destilada, seguido de calentamiento hasta disolución total. Esterilización en autoclave a 121°C durante 15 min. Luego se colocaron 2,5 mL en tubos de Khan estériles y se dejan enfriar semi - inclinados, de manera de obtener base y bisel.

-Urea de Christensen

Composición: en g/L: 1 g de peptona, 5 g de NaCl, 1 g de glucosa, KH_4PO_4 , solución alcohólica al 0,2% de rojo fenol, 20 g de agar. El indicador usado en este medio es amarillo a pH = 6,9 y rojo a pH = 8,5.

Preparación: Se pesan 24 g de medio (medio de Christensen) y se disuelve en 1 L de agua destilada, se calienta hasta disolución total y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min. Una vez esterilizado se agrega solución de urea al 40% (40 g de urea en 100 mL de agua destilada) con pipeta (50 mL de urea por L de agua destilada), y se colocan 1,5 mL en tubos de Khan estériles y se dejan enfriar inclinados de manera que el medio solidifique en forma de bisel, toda la preparación se llevó a cabo en condiciones estériles.

-Reactivos y Soluciones

Reactivo de Kovac's: se disuelve 3 g de p-di CH_3NH_2 -benzaldehído en 75 mL de butanol y se agregan 25 mL de HCl concentrado. Se conserva en refrigeración y al abrigo de la luz (frasco color caramelo) (utilizado en la prueba de SIM).

Alfa-naftol: solución alcohólica al 5% (utilizado en la prueba de Voges Proskauer).

KOH: solución acuosa al 40% que puede o no contener creatina al 0,3% (utilizado en la prueba de Voges Proskauer).

Rojo de metilo: se disuelve 0,1 g de indicador en 300 mL de etanol al 95%, llevando luego el volumen a 500 mL con agua destilada (utilizado en la prueba de rojo de metilo).

buffer de cloruro sódico-Tris-EDTA (STE)