



LA MICROBIOTA INTRAUTERINA AL POSTPARTO

Rodrigo C. Bicalho DVM, PhD

*Assistant Professor of Dairy Production Medicine
Veterinary College, Cornell University.*

Metritis y endometritis en vacas lecheras

La enfermedad uterina al postparto (específicamente metritis puerperal, endometritis clínica y endometritis subclínica) es importante por razones económicas y de bienestar ya que contribuyen al disconfort de la vaca, su eliminación del rodeo, y un efecto negativo profundo en la performance reproductiva.

La prevalencia de metritis clínica y endometritis subclínica varía considerablemente entre los diferentes estudios; consecuencia de la no estandarización de las definiciones de los casos utilizadas por los diferentes investigadores en este campo (Azawi, 2008). Los tambos a los que proveemos de servicios veterinarios localizados cerca de Ithaca, New York, normalmente diagnostican y tratan la metritis clínica en el 15% a 25% de todas las vacas en producción. En el noreste de Florida se reportó que la incidencia de metritis clínica fue de 21% de las vacas de un tambo (Benzaquen et al., 2007). Gilbert et al., (2005) reportaron una incidencia de endometritis de 53% usando un método de citología uterina.

Antes del parto el lumen uterino está libre de bacterias y la invasión bacteriana ocurre en los abortos o pérdidas embrionarias (Semambo et al., 1991). Sin embargo, en el comienzo del parto se encuentran comprometidas las barreras físicas de cérvix, vagina y vulva, permitiendo que las bacterias ambientales asciendan dentro del lumen uterino. De hecho, 80-100% de todas las vacas lecheras tienen contaminación bacteriana del útero en las primeras 2 semanas postparto (Foldi et al., 2006; Azawi, 2008). Sin embargo, solo una proporción de las vacas desarrollará alguna vez enfermedades uterinas (Sheldon, 2004). Por tanto, las vacas normales resolverá la contaminación uterina mediante una rápida involución del útero y cérvix, descargando los contenidos uterinos, y la movilización de las defensas naturales del hospedero (Azawi, 2008).

El desarrollo de enfermedad uterina postparto es, por lo tanto, dependiente del estatus inmunológico de la vaca, las especies de bacterias, y la carga de contaminación del lumen uterino (Sheldon, 2006a). *Escherichia coli* y *A. pyogenes* son considerados las bacterias más importantes asociadas con infección uterina. Investigaciones recientes indican que el útero infectado en la primera semana postparto es predominado por *E. coli* la cual afecta el fenotipo y función de las células polimorfonucleares que soportan la infección subsecuente por *A. pyogenes* en la segunda semana postparto (Dohmen et al., 2000; Zerbe et al., 2001). Estas infecciones causan inflamación uterina, la cual se cree que resulta en involución uterina demorada y daño al embrión, provocando una peor fertilidad o una fertilidad demorada (Azawi, 2008). La terapia antibiótica intrauterina es usada comúnmente como el tratamiento de elección

para la metritis clínica (Sheldon et al., 2004).

Caracterización molecular y epidemiológica de la *Escherichia coli* del útero bovino

Se cree que *Escherichia coli* está asociada con metritis postparto y endometritis pero su rol en la patogénesis de ambas enfermedades todavía no se ha definido. En este estudio, se recolectaron hisopos uterinos para aislamiento de *Escherichia coli*, de 374 vacas Holstein en lactación estabuladas en cuatro tambos comerciales cerca de Ithaca, New York. Un total de 125 de 374 vacas (33,4%) fueron positivas para el cultivo de *E. coli*. Se utilizaron protocolos de PCR multiplex estándar para hacer un screening de los aislamientos en busca de 32 factores de virulencia.

E. coli es un habitante normal del tracto gastrointestinal y juega un rol pivot en la salud de los mamíferos como un organismo comensal. Sin embargo, varias cepas de *E. coli* son capaces de causar enfermedades en humanos y animales y algunas son extremadamente patogénicas tales como la *E. coli* O157:H7 (Kaper et al., 2004). El rol de *E. coli* en la patogénesis de la metritis y endometritis es poco entendido (Silva et al., 2009). Recientemente, dos equipos de investigación han caracterizado parcialmente diferentes colecciones de aislamientos de *E. coli* del útero de vacas al postparto (Silva et al., 2009; Sheldon et al., 2010). Silva et al. Evaluaron 15 genes factores de virulencia (FV) de *E. coli* y ninguno estaba asociada con la enfermedad uterina. Un estudio diferente de Sheldon et al., (2010), evaluó 17 genes FV y se encontró que el FV *fyuA* estaba asociado con la enfermedad uterina; también se confirmó la expresión del gen FV *fimH* mediante un ensayo de adhesión in vitro luego de tratamiento con manosa. Por lo tanto, el rol de *E. coli* en la patogénesis de la metritis y endometritis aún no tiene respuesta.

El objetivo del presente estudio fue el de evaluar la epidemiología molecular de 32 genes FV de *E. coli* y sus asociaciones con la incidencia de endometritis y metritis postparto usando una gran muestra de 374 vacas Holstein de cuatro tambos diferentes.

Tambo, manejo y toma de muestras

Se recolectaron los datos de cuatro tambos localizados cerca de Ithaca, Nueva York, desde el 17 de Agosto al 29 de enero de 2010. El tambo A ordeñaba 2800 vacas, el tambo B ordeñaba 3000 vacas, el tambo C ordeñaba 1600 vacas y el tambo D ordeñaba 1000 vacas. Estos tambos fueron seleccionados debido a su larga relación de trabajo con la Ambulatory and Production Medicine Clinic de la Universidad de Cornell. Los rodeos consistían en vacas Holstein estabuladas en establos libres con cama de pulpa de papel. Las vacas eran ordeñadas 3 veces al día. Todas

las vacas lactantes recibieron una ración consistente en aproximadamente 55% de forraje (silo de maíz, ensilaje, paja de trigo) y 45% de concentrado (harina de maíz, harina de soja, canola, semilla de algodón y pulpa de cítrico) en base de materia seca en la dieta. La dieta fue formulada para cumplir o exceder los requerimientos NRC nutricionales para vacas Holstein en lactación que pesen 650 kg y que produzcan 45 kg de leche con 3,5% de grasa corregida.

Los hisopados uterinos fueron realizados por el equipo de investigación (5 veterinarios y un estudiante de veterinaria) en un total de 374 vacas (200 vacas en el tambo A, 70 en el B, 63 en el C y 41 en el tambo D). Los días promedio de lactación al muestreo fueron 2 a 7. Los hisopados uterinos fueron colectados de la siguiente manera: las vacas eran sujetadas y el área perineal era limpiada y desinfectada con una solución de alcohol etílico de 70%. Luego se introducía en la vagina craneal un hisopo estéril (Har-Vet™ McCullough Double-Guarded Uterine Culture Swab, Spring Valley, WI) cubierto con una pipeta estéril (dentro de una vaina plástica). La pipeta fue manipulada a través del cérvix dentro del útero. Allí se rompía la vaina, y se exponía el hisopo a la secreción uterina. El hisopo se empujaba dentro de la pipeta y se mantenía en medio de transporte a 4°C hasta que se lo procesaba en el laboratorio.

Definición de caso

La metritis se definió como presencia de descarga fétida, acuosa, marrón-rojiza, asociada con signos sistémicos de enfermedad, y temperatura rectal >39.5°C. El diagnóstico de metritis fue evaluado por los empleados del tambo en los primeros 14 días de la lactancia. La endometritis clínica fue evaluada en una submuestra de vacas que consistió en 117 vacas; evaluación llevada a cabo por el equipo de investigación a los 28±3 días de lactancia. La endometritis clínica se definió como la presencia de descarga purulenta o mucopurulenta, mediante la recuperación de mucus vagina utilizando el dispositivo Metrichick (Metrichick, SimcroTech, Hamilton, New Zealand) según lo descrito en un estudio previo (McDougall et al., 2007)

Aislamiento bacteriano y extracción de ADN

Se llevó los hisopados uterinos al laboratorio y se los cultivó de manera aeróbica en agar MacConkey (Difco) a 37°C y se distinguió las colonias de *E. coli* por un color rojo-púrpura. Se tomó cinco colonias típicas de *E. coli* del agar MacConkey y pasadas a CHROMagar-*E. coli* para aislamiento y posterior identificación de cepas de *E. coli*. Las colonias seleccionadas fueron guardadas en caldo Luria-Bertani (LB) conteniendo 20% de glicerol a -80°C. Se extrajo el ADN utilizando InstaGene Matrix™ (Bio-Rad) según lo descrito previamente (Higgins et al., 2007).

PCR y electroforesis en gel

Todas las reacciones fueron realizadas en un volumen de 25- μ L usando 24- μ L de 1X Green GoTaq® Master Mix (hecho de 2X Green GoTaq® Master Mix consistente en Green GoTaq® Reaction Buffer, 400 μ MdATP, 400

μ MdGTP, 400 μ MdCTP, 400 μ MdTTP y 3mM MgCl₂; Promega Corp., Madison, WI) y primers, y 1 μ L de extracto de ADN. Todos los protocolos de ciclado termal fueron realizados en un 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, CA). Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis a través de gel de agarosa 1,2% (p/v), teñido con 0,5 μ g/ml de bromuro de etidio, y se los visualizó con un KODAK Gel Logic 100 Imaging System (GL 100). Los amplificados que tenían el tamaño molecular esperado fueron considerados positivos.

Se realizó un *cdt*PCR multiplex usando cuatro pares de primers para detectar aislamiento de *E. coli* que tenía secuencias comunes a genes *cdtB*, según lo descrito (Toth et al., 2003). Las condiciones de ciclado termal fueron de 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto y 72°C por un minuto, y un paso final de 72°C por 10 minutos (Toth et al., 2003). Los aislamientos de *E. coli* que produjeron un producto de PCR de 466 pb fueron considerados positivos para la presencia de genes *cdtB*.

Se realizó un PCR Multiplex 16plex para evaluar los aislamientos de *E. coli* que presentaron genes relacionados con *E. coli* productora de diarrea; en este PCR se usaron 16 pares de primers para detectar 16 genes FV (*eaeA*, *escV*, *ent*, *bfpB*, *EHEC-hly*, *stx1*, *stx2*, *ipaH*, *invE*, *astA*, *aggR*, *pic*, *elt*, *estIa*, *estIb*, and *uidA*) según lo descrito (Antikainen et al., 2009)

Los parámetros de ciclado fueron 98°C por 30s, 30 ciclos a 98°C por 10s, 63°C para 20°C, y 72°C por 30s, con un paso final a 72°C por 10 minutos (Antikainen et al., 2009).

Además, se realizó un PCR Multiplex 15plex PCR para identificar FVs asociados con UPEC; se usaron q5 pares de primers para detectar 15 genes VF [*papAH*, *PapG* (allele I), *PapG* (allele II), *PapG* (allele III), *fimH*, *afa/draBC*, *sfa/focDE*, *hlyA*, *cnf1*, *iutA*, *fyuA*, *kpsIII*, *traT*, *ibeA*, *malX*, *PAI*] según lo descrito por (Moreno et al., 2005).

Para facilitar la interpretación de las imágenes del gel, los primers fueron separados en dos pools. El Pool A estaba compuesto de 8 pares de primers (Allele III f, Allele III r, Afa f, Afa r, sfa 1, sfa 2, hlyA f, hlyA r, cnf1, cnf2, FyuA f, FyuA r, TraT f, TraT r, lbe10 f, and lbe10 r), y el Pool B estaba compuesto de siete pares de primers (PapA f, PapA r, Allele I f, Allele I r, Allele II f, Allele II r, FimH f, FimH r, AerJ f, AerJ r, kps II f, kps II r, RPAi f, and RPAi r). El PCR de los pools A y B fue realizado por separado; el protocolo del ciclo termal fue: 95°C por 12 minutos, seguido de 25 ciclos a 94°C por 30s, 63°C por 30s, y 68°C por 3 minutos, seguidos de una extensión final a 72°C por 10 minutos (Moreno et al., 2005).

Resultados y Discusión

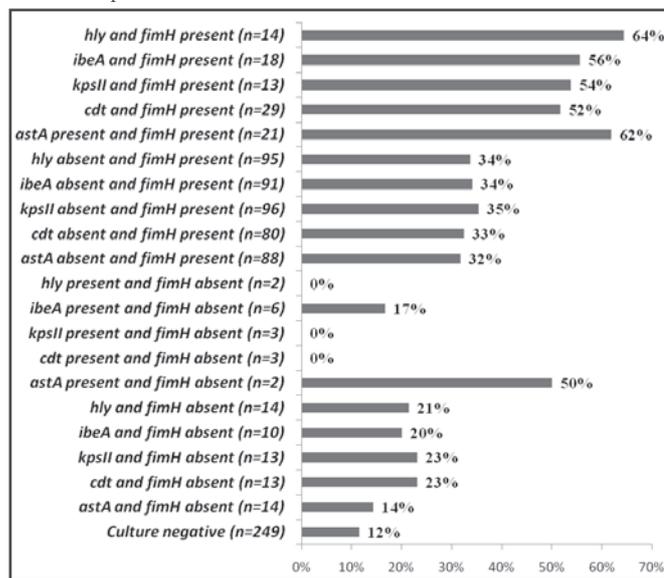
El presente estudio demostró que la IUEC estaba asociada con la infección uterina puerperal. Las vacas lecheras infectadas con IUEC en el período postparto temprano (3-7 días postparto) tuvieron un riesgo mayor de desarrollar endometritis clínica y metritis puerperal a aproximadamente 35 días y 10 días postparto respectivamente. Como consecuencia de la infección uterina por IUEC, la performance reproductiva de las



vacas afectadas se vio disminuida severamente.

Se sabe que muchos factores relacionados con las vacas incrementan el riesgo de metritis al facilitar el acceso de bacterias ambientales dentro de lumen uterino (parto asistido y placenta retenida) (Benzaquen et al., 2007) o al permitir un crecimiento bacteriano excesivo dentro del lumen uterino (por ejemplo parto de mellizos y sistema inmune deprimido) (Sheldon et al., 2006). En el presente estudio, observamos que el estatus del ternero recién nacido (mellizo, mortinatos, y sexo) afectaba significativamente la probabilidad de contaminación intrauterina por *E. coli*. Por ejemplo.

Figura 1: Ilustración gráfica de la interacción de *astA*, *cdt*, *kpsMII*, *ibeA*, y *hlyA* con *fimH* en la incidencia de metritis. Para este análisis se usaron solo vacas positivas a los cultivos.



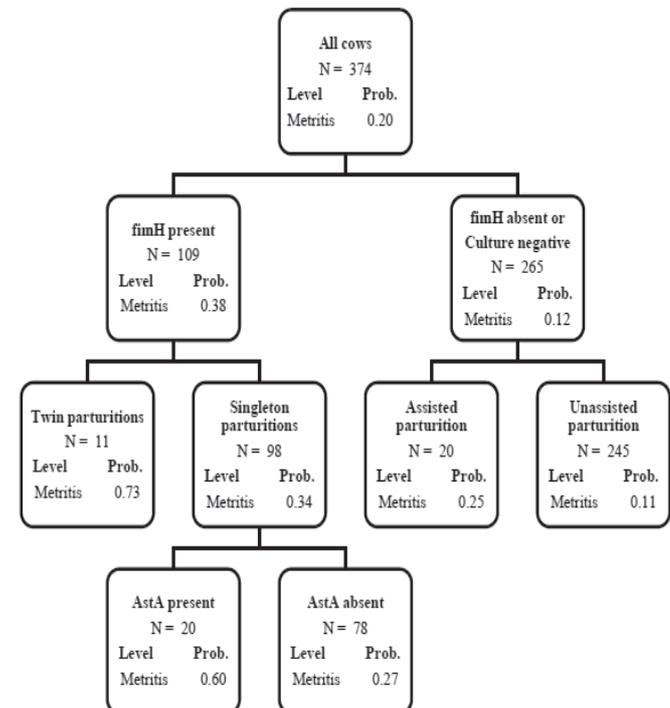
Las vacas que tuvieron parto de mellizos tuvieron 4,4 veces más probabilidad de ser infectadas con una IUEC (Tabla 1).

Investigación epidemiológica previa de nuestro grupo demostró que el tener mellizos, el peso del ternero y el parto de mortinatos disminuyó significativamente la eficiencia reproductiva y la supervivencia de la vaca (Bicalho et al., 2007a; Bicalho et al., 2007b; Linden et al., 2009). El presente estudio sumó nuevos e importantes conocimientos en como los factores relacionados con el parto se encuentran asociados con una pobre eficiencia reproductiva, mediante la asociación del estatus del ternero recién nacido con la probabilidad de infección por IUEC. La significancia de *E. coli* en la patogénesis de la infección uterina puerperal es poco conocida y algunos estudios han intentado dilucidar el rol etiológico de *E. coli* en este proceso. Recientemente, una colección de cepas de *E. coli* de útero bovino fue sometida a un screening en busca de la presencia de 15 genes FV y no se encontró ninguno asociado con enfermedad uterina (Silva et al., 2009). Silva et al. (2009) concluyeron que la *E. coli* uterina era meramente un bacteria ambiental oportunista, ya que ninguno de los factores de virulencia evaluados parecían afectar la probabilidad de infección uterina. En contraste, el presente estudio evaluó un total de 32 FV de los cuales seis estuvieron significativamente asociados con la

incidencia de metritis y endometritis. La identificación de los genes FV *fimH*, *astA*, *cdt*, *kpsMII*, *ibeA*, y *hlyA* incrementó el riesgo de enfermedad uterina y falla reproductiva (Figura 1), y estos FV significativos no fueron evaluados por Silva et al. Sheldon et al. evaluaron el efecto de 17 genes FV y ninguno de ellos estaba asociado con enfermedad uterina. De los seis FV significativos (*fimH*, *astA*, *cdt*, *kpsMII*, *ibeA*, and *hlyA*) encontrados en el presente estudio, *ibeA* fue el único FV que también fue evaluado por Sheldon et al. y ninguno de los aislamientos en ese estudio fueron *ibeA*-positivos. Sin embargo, en el presente estudio se analizaron un total de 374 vacas y un total de 625 aislamientos bacterianos, lo cual conforma una muestra mucho mayor comparada con los estudios previos (Silva et al., 2009; Sheldon et al., 2010).

En humanos, *E. coli* es una causa mayor de infección del tracto urinario (UTI), estimada como la causa primaria en >80% de las UTI adquiridas en la comunidad (Struelens et al., 2004). Probablemente la UTI humana se inicia por contaminación de la uretra y la vejiga por *E. coli* fecal, incluyendo UPECs y flora comensal. Horas después de la contaminación el ambiente de la vejiga se seleccionará rápidamente hacia bacterias que expresan fimbria tipo I, y la seguirá la colonización del tejido y el daño (Kaper et al., 2004).

Figura 2: Árbol de análisis de partición que ilustra el orden jerárquico de los factores de riesgos para metritis. El árbol indica que el factor de virulencia *fimH* es el predictor más importante de metritis, y las variables nacimiento, parto y el factor de virulencia *astA* fueron los segundo, tercer y cuarto factores predictores más relevantes, respectivamente.



En el presente estudio, *fimH* fue altamente prevalente en vacas infectadas por *E. coli* y fue un importante predictor de metritis y endometritis (Figura 2). Los pili tipo 1 conteniendo la fimbria adhesina están virtualmente presentes en todas las UPEC, y la inmunización a *fimH* en un modelo murino previno la colonización in vivo de la



mucosa vesical en un 99% (Langermann et al., 1997). En la metritis bovina, estudios recientes indican que el útero infectado en la primera semana postparto predomina *E. coli*, la cual altera el ambiente uterino de tal manera que permite la infección futura por otra bacteria oportunista anaeróbica en la segunda semana postparto (Dohmen et al., 2000; Zerbe et al., 2001). Sheldon et al (2010), concluyeron que la *E. coli* endometrial patógena expresan el gen *fimH* ya que el tratamiento con Manosa de los aislamientos de *E. coli* disminuyó su capacidad de adherirse a células endometriales.

El grupo ExPECs es diverso e incluye mucho patotipos, incluyendo UPEC, *E. coli* de meningitis neonatal (NMEC), *E. coli* patógena aviar (APEC), *E. coli* necrotoxigénica (NTEC), y la descrita IUEC.

Todas las ExPECs encontrará similares desafíos durante el proceso de establecer infecciones extraintestinales, y como consecuencia tienen mayor probabilidad de compartir genes FV similares (Johnson et al., 2008). Las bacterias IUEC descrita en este estudio presentan numerosas relaciones con las ExPECs humanas y APECs. El gen FV *ibeA* (invasión del endotelio del cerebro) juega un importante papel en la meningitis neonatal gram-negativa en humanos, provocado principalmente por transmisión vertical de *E. coli* (Huang et al., 2001). Se ha sugerido que *ibeA* contribuye a la invasividad de *E. coli* dentro de las células del endotelio de la microvasculatura cerebral (BMECs) vía interacción ligando-receptor (Huang et al., 2001).

Es posible que esa interacción ligando-receptor pueda verse facilitada por la expresión de *ibeA* en los tejidos mamíferos diferentes a BMECs, tales como el endometrio. También se ha reportado que *ibeA* juega un importante papel en la patogénesis de la infección intrainestinal de pájaros por APECs. Germon et al. demostraron que la virulencia de una APEC mutante libre de *ibeA* se redujo en comparación con APEC que expresaba *ibeA*. La prevalencia de *ibeA* en el presente estudio fue de 19,2%, lo cual no es muy diferente a la prevalencia hallada en APECs (26%) (Germon et al., 2005), NMECs (33 – 40%) y aislamientos vaginales (32%) (Johnson et al., 2001); (Obata-Yasukoa et al., 2002). El gen FV *kpsMIII* codifica las proteínas capsulares K1 o K5 y han sido asociados con celulitis en pollos (de Brito et al., 2003), y UTI en mujeres (Moreno et al., 2005; Moreno et al., 2009). En el presente estudio *kpsMIII* fue encontrado en 12,8% de las vacas positivas a *E. coli*, lo cual es comparable con el 16% de prevalencia encontrado en pollos (de Brito et al., 2003) y el 21% hallado en UTI en humanos (Johnson et al., 2002). Otro gen FV significativo encontrado en el presente estudio codifica *hly*, el cual es una proteína extracelular termolábil sintetizada por una gran proporción de aislamientos ExPEC (Smith et al., 2008). La toxina *hly* es responsable de crear poros en la membrana y lisar varios tipos de células mamíferas (Lally et al., 1999). Un total de 12,8% de las vacas positivas a *E. coli* en este estudio fueron portadoras de bacterias con el gen *hlyA*. El análisis de partición realizado en este estudio reveló que el gen FV *astA* es un importante predictor de metritis, solamente en segundo lugar luego de *fimH*. Un total de 18,5% de las vacas positivas a *E.*

coli fueron infectadas con una IUEC positiva a *astA*. Las vacas con una IUEC que portaba *astA* tuvieron 12 veces más probabilidad de desarrollar metritis postparto y 4,6 veces más probabilidad de desarrollar endometritis comparadas con las vacas negativas a *E. coli*. El gen *astA* es una característica importante de *E. coli* enteroagregativa (EAEC), lo cual es una causa común de diarrea en humanos, especialmente diarrea en niños en los países en desarrollo; sin embargo, más recientemente, las EAECs también han sido asociadas con infecciones a partir de alimentos en países industrializados (Nataro et al., 1998).

El gen *astA* codifica una proteína de 38 aminoácidos llamada enterotoxina 1 termoestable de *E. coli* enteroagregativa (EAST1) (Veilleux y Dubreuil, 2006). El rol específico de EAST1 en la patogénesis de diarrea relacionada con EAEC todavía no está completamente entendida (Veilleux y Dubreuil, 2006). A pesar de que *astA* es detectado normalmente en EAEC, también ha sido detectado en otros patotipos de *E. coli* como la *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteropatogénica (EPEC) y *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) así como otras especies bacterianas como *Salmonella* (Paiva de Sousa and Dubreuil, 2001). Abe et al. demostraron que las UPECs pueden poseer genes de la *E. coli* diarreagénica, especialmente FV asociados con EAEC. No se sabe si las cepas de ExPECs han adquirido genes EAEC o si algunas EAEC's están involucradas en infecciones extraintestinales como UTI (Abe et al., 2008). Sin embargo, nuestro estudio sugiere que EAST1 puede jugar un importante rol en la patogénesis de infecciones uterinas al postparto. También se llevó a cabo un PCR multiplex para la detección de genes que codifican la toxina distensora citoletal (CDT) y capaz de detectar CDT-I, CDT-II, CDT-III y CDT-IV. Un total de 25,6% de las vacas positivas a *E. coli* fueron *cdt* positivas, y cuando el gen *cdt* fue detectado en conjunción con el gen *fimH*, 52% de las vacas desarrolló metritis postparto en comparación con sólo 12% de las vacas negativas al cultivo. Las toxinas distensoras citoletales conforman una familia única de toxinas que causan un agrandamiento característico de células mamarias específicas seguido de la muerte de esas células (De Rycke y Oswald, 2001). A pesar de que *cdt* fue identificada inicialmente en una EPEC ahora se sabe que *cdt* se encuentra ampliamente presente en otros patotipos de *E. coli*, principalmente en ExPECs (Toth et al., 2003) Por último, las secuencias de ADN girasa de 41 IUECs genéticamente distintas fueron alineadas con una variedad de bacterias entéricas, incluyendo 33 cepas de referencia de *E. coli*. El árbol filogenético (Figura 4) reveló que las IUECs caen dentro de dos clados principales: un clado de todas las ExPECs y un clado compuesto principalmente de IUECs que se encuentra adyacente al clado de las ExPEC. Se ha sugerido que se prefiere el uso del gen *gyrB* para análisis filogenéticos de cepas bacterianas muy relacionadas, sobre el uso de la región 16S ARNt debido a que el gen *gyrB* evoluciona a una tasa mayor, proveyendo más heterogeneidad para el análisis (Fukushima et al., 2002). Fukushima et al. sugirieron la región *gyr B* podía tener alta confiabilidad para la identificación de bacterias patógenicas.



Es importante saber que en el presente estudio no se intentó el aislamiento de especies bacterianas diferentes a *E. coli* y que es posible que los desórdenes uterinos sean causados por una infección mixta y que se necesita mayor investigación para completar nuestro conocimientos sobre la etiología de la metritis y el rol jugado por *E. coli*. Sin embargo, la identificación de genes FV de *E. coli* asociados con metritis/endometritis es una importante evidencia hacia la consideración de *E. coli* como un patógeno para infecciones uterinas primarias. Además, nuestro estudio fue realizado sobre una gran población con varios cientos de vacas enroladas y se utilizaron varios modelos logísticos de regresión para analizar 11 genes Fv diferentes; lo cual pudo haber favorecido la ocurrencia de un error estadístico tipo 1. En resumen, las IUECs fueron asociadas con metritis y endometritis postparto. Además, se identificaron muchas similitudes entre ExPECs e IUECs tales como la presencia de genes FV *fimH*, *astA*, *cdt*, *kpsMIII*, *ibeA*, y *hlyA*, y su asociación con metritis y endometritis. Un factor de virulencia importante de al EAEC (*astA*) también fue prevalente entre los aislamientos IUEC y cuando estaban presentes incrementaron significativamente las chances de metritis. Por lo tanto, hubo seis genes FV importantes asociados con metritis y endometritis: *fimH*, *astA*, *cdt*, *kpsMIII*, *ibeA*, y *hlyA*. El gen *fimH* fue el FV más prevalente y el más significativo. Los FV *astA*, *cdt*, *kpsMIII*, *ibeA*, y *hlyA* fueron altamente patogénicos cuando se los detectó en conjunción con *fimH*.

ANÁLISIS METGENÓMICO DE LA MICROBIOTICA BACTERIANA UTERINA EN VACAS LECHERAS SANAS Y CON METRITIS AL POSPARTO

Introducción

La metritis es uno de los desórdenes reproductivos más importantes en el ganado y es resultado de la contaminación bacteriana luego del parto (Dohmen et al., 2000; Azawi, 2008). *Escherichia coli* y *Arcanobacterium pyogenes* son tradicionalmente consideradas las bacterias más relevantes involucradas en la patogénesis de la metritis debido a su persistencia en el útero contaminado (Sheldon et al., 2002; Williams et al., 2005; Miller et al., 2007; Sheldon et al., 2010). Sin embargo otros muchos microorganismos patogénicos tales como *Fusobacterium necrophorum*, *Prevotella melaninogenica*, *Bacteroidetes* spp., *Pseudomonas* spp., *Streptococcus* spp., y *Staphylococcus* spp., en una variedad de combinaciones, han sido aislados de úteros infectados de vacas con metritis y se sugiere que son responsables de la metritis puerperal (Williams et al., 2005; Azawi, 2008).

Clásicamente, la caracterización de la microbiota uterina patogénica en bovinos ha descansado sobre el cultivo de la secreción uterina.

A pesar de que reconocemos el valor del cultivo de los patógenos, es posible que estudios previos hayan subestimado la complejidad microbiana del ambiente intrauterino de las vacas al postparto dado que menos de 1% de los microorganismos en muchos ambientes ya fueron cultivados bajo condiciones estándar de laboratorio

(Amman et al., 1995; Whitman et al., 1998). Frente a las limitaciones intrínsecas asociadas con los métodos tradicionales de cultivo se han fijado nuevos paradigmas, y los métodos de cultivos independientes, tal cual lo propuesto por la metagenómica (Rondon et al., 2000, Handelsman, 2004) hoy son fundamentales para estudiar y entender la fisiología, genética y la estructura de la ecología comunitaria de la "mayoría no vista".

A pesar de que la composición microbiana uterina ha sido exhaustivamente estudiada basándose en los cultivos tradicionales, aún no se han realizado métodos cultivo-independientes. En este estudio presentamos un análisis comparativo descriptivo de conformación bacteriana del ambiente intrauterino de las vacas lecheras al postparto, investigando si existen diferencias importantes entre vacas saludables y vacas con metritis puerperal.

Muestreo de fluido uterino

El fluido intrauterino fue muestreado a partir de un total de 20 vacas Holstein entre noviembre y diciembre de 2009 en 2 tambos comerciales cerca de Ithaca, Nueva York. Se recolectó fluido de 5 vacas sanas al postparto y 5 vacas con diagnóstico de metritis puerperal de cada tambo, utilizando un catéter Foley. Brevemente, se manipuló un catéter Foley a través del cérvix, el globo del catéter fue inflado inmediatamente pasado el cérvix y se liberó un litro de solución salina estéril dentro del útero, y aproximadamente 0,5 litros fueron recuperados dentro de un frasco de vidrio. Las muestras fueron mantenidas a 4°C durante el transporte hasta su procesamiento. La metritis puerperal fue definida clínicamente como un útero anormalmente agrandado, con una descarga acuosa fétida roja-marrón, con signos de enfermedad sistémica (disminución de la producción lechera, decaimiento u otros signos de toxemia) y fiebre (>39.5 °C), dentro de los 21 días posteriores al parto (Sheldon et al., 2006). Mientras, se determinó a las vacas sanas como las que tenían ausencia de descarga acuosa fétida rojo-marrón y otros signos de metritis según lo descrito por Sheldon et al., 2006).

Extracción de ADN a partir del fluido uterino

Se revolviaron las muestras para dispersar cualquier tejido sólido o mucus y se filtro en una gasa estéril aproximadamente 250 ml de fluido uterino de cada vaca con el mismo estatus de salud del mismo tambo, y se hizo un pool con el fin de formar 4 muestras mezcladas. Se centrifugó aproximadamente 30 ml de la muestra del pool durante 30 minutos a 15.000 x g a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el resto se re suspendió en 2 ml de 1 x buffer PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄) [pH 7.4].

El aislamiento del total del ADN metagenómico se realizó a partir de 400 μ L de la suspensión utilizando un QIAamp DNA minikit (Qiagen, Santa Clarita, CA, USA) según las instrucciones del fabricante para la purificación de ADN a partir de sangre o fluidos corporales. Se incluyeron algunas modificaciones convenientes, tales como la adición de 400 μ g de lisozima y la incubación por 12 h a 56 °C, con el fin de maximizar la extracción de ADN bacteriano. El ADN total fue diluido en 50 μ L de agua libre

de DNase/RNase (Promega, Madison, WI, USA). La concentración y pureza del ADN fueron evaluadas mediante densidad óptica usando el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Rockland, DE, USA) a una longitud de onda de 230, 260 y 280 nm. Se aseguró la integridad a través de un gel de electroforesis de 0,8% (p/v) de agarosa, teñido con 0,5 μ g/ml de bromuro de etidio, y visualizado con el MiniBIS Pro (DNR Bio-Imaging System Ltd., Jerusalem, Israel).

Construcción y secuenciación de la biblioteca de genes del 16S rARN

Se realizó el PCR de los fragmentos 16S rARN de los genes bacterianos del ADN metagenómico extraído del fluido uterino de las vacas, utilizando los primers 27F/1518R según lo descrito previamente. Se realizó PCR por triplicado y se hizo un pool antes del clonado. Se incluyeron controles y blancos apropiados. Los productos de la amplificación fueron sometidos a electrophoresis a través de un gel de agarosa 1,2% (p/v), teñido con 0,5 μ g/ml de bromuro de etidio, y se lo visualizó bajo luz ultravioleta. Los resultados positivos fueron considerados como un pool de amplicones que tenían el tamaño molecular esperado (~ 1.5-kb). Además, se evaluó la concentración y pureza mediante densidad óptica usando el espectrofotómetro the NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies) a una longitud de onda de 230, 260 y 280 nm. Los productos del PCR fueron purificados del gel de agarosa previo a la clonación utilizando PrepEase Gel Extraction Kit (USB) y fueron clonados en un vector TA usando el TOPO TA cloning kit (Invitrogen). Se construyeron un total de 4 16S rRNA gene libraries.

Para propósitos del clonado, se transformaron células, One Shot Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen) con la concentración apropiada de plásmidos, según las instrucciones del fabricante, y se las hizo crecer de manera aeróbica durante la noche en medios LB sólidos conteniendo containing kanamicina (50 μ g/ml)/X-gal [5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo] (80 g/ml) (Sigma-Aldrich) a 37°C. Luego de la incubación nocturna, se tomó de los platillos colonias blancas individuales al azar, se las colocó en 3 mL de líquido de LB/Kanamicina (50 μ g/ml) y se las hizo crecer de manera aeróbica por 16-18 horas a 37 °C. Se extrajeron plásmidos del los clones usando el QIAPrep Spin Miniprep kit (Quiagen) y los fragmentos clonados de gen 16S rARN fueron secuenciados usando un primer vector M13. Todos los clones que contenían insertos del tamaño correcto fueron almacenados en medio LB conteniendo 20% de glicerol (v/v) a -80°C.

Generalmente, en la mayoría de los casos se secuenció solo una hebra de los fragmentos de ADN. Este criterio mostró ser suficiente para la identificación taxonómica de los fragmentos clonados de 16S rARN usando la función de búsqueda BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al., 1990). En aquellos casos en los que la secuencia no podía ser asignada fácilmente a un grupo taxonómico particular o en los que la calidad de la secuencia de nucleótidos no podía ser claramente determinada, se secuenció ambas hebras de ADN.

Resultados y Discusión

Estudios previos sobre patógenos causantes de metritis en rodeos han medido solo la porción cultivada de la diversidad bacteriana del útero luego del parto, y han mostrado que esta fracción de la microbiota es relativamente diversa (Sheldon et al., 2002; Williams et al., 2005; Williams et al., 2007). En el presente estudio, se utilizó un abordaje independiente del cultivo para describir y comparar la conformación filogenética de las comunidades bacterianas intrauterinas de las vacas lecheras al postparto. La búsqueda BLASR de las secuencias de fragmentos de genes 16S rARN obtenidas de las bibliotecas de clones del fluido intrauterino de vacas sanas y con metritis reveló que en estas bibliotecas de clones estaban representados 5 grupos conocidos y un grupo perteneciente a bacterias no cultivadas.

A pesar de que la mayoría de los clones de la biblioteca de "estatus de metritis" pertenecían al phylum Fusobacteria, Bacteroidetes, and Proteobacteria (particularly, Gammaproteobacteria), muchos clones tenían secuencias que eran poco parecidas idénticas a las secuencias de bacterias conocidas. Nosotros sugerimos que estas secuencias pertenecen a grupos de bacterias no cultivadas o posiblemente representen nuevas ramas bacterianas no relacionadas, o distantemente relacionadas con microorganismos cultivados conocidos. Un número conspicuo de clones encontrados en estas dos bibliotecas fueron afiliados con *F. necrophorum* y *Porphyromonas*.

Ambas bacterias han sido aisladas exhaustivamente a partir infecciones importantes a nivel reproductivo bovino (Sheldon et al., 2004; Blum et al., 2007) y su presencia pareció un obvio *F. necrophorum* subsp. *Funduliformeis* reconocido por su alta relevancia en el establecimiento de infección uterina en la vaca cattle (Williams et al., 2005; Azawi, 2008); y *P. levii*, un patógeno humano y veterinario de importancia emergente, ha sido asociado con casos de vulvovaginitis necrótica bovina (Elad et al., 2004). Además, las secuencias encontradas en estas dos bibliotecas fueron altamente similares a las secuencias de *H. somnus*, *Peptostreptococcus anaerobius*, and *Veillonellaparvula*, que son conocidos primariamente como causantes de otros síndromes humanos y animales, tales como enfermedades peridontales o respiratorias (Aarestrup et al., 2004; Rocas and Siqueira, 2006; Rocas and Siqueira, 2008).

En bibliotecas de "estatus saludable", la mayoría de las secuencias de clones fue afiliada con *M. varigena* y *U. diversum*. A pesar de que ambas bacterias están asociadas con enfermedades bovinas (Doig et al., 1980; Catry et al., 2004), solo *U. diversum*, cuyos mecanismos patogénicos involucrados en infecciones aún no se conocen, ha sido asociado con infección en el tracto reproductivo de las vacas (Doig et al., 1980) e infertilidad (Kreplin et al., 1987). El gen Mannheimina es heterogéneo (Angen et al., 1999) y comprende bacterias con una amplia variedad de tipos de vida. Mannheimia avarigena ha sido aislada en pulmones bovinos neumónicos, mastitis y septicemia, y como un comensal común en las membranas mucosas del tracto respiratorio superior (Blackall et al., 2002). Las secuencias relacionadas con



otras bacterias patogénicas reconocidas, tales como *Streptococcus* y *Mycoplasma*, fueron identificadas pero no se encontró ninguna secuencia relacionada con bacterias no cultivadas en ambas bibliotecas de “estatus saludable”.

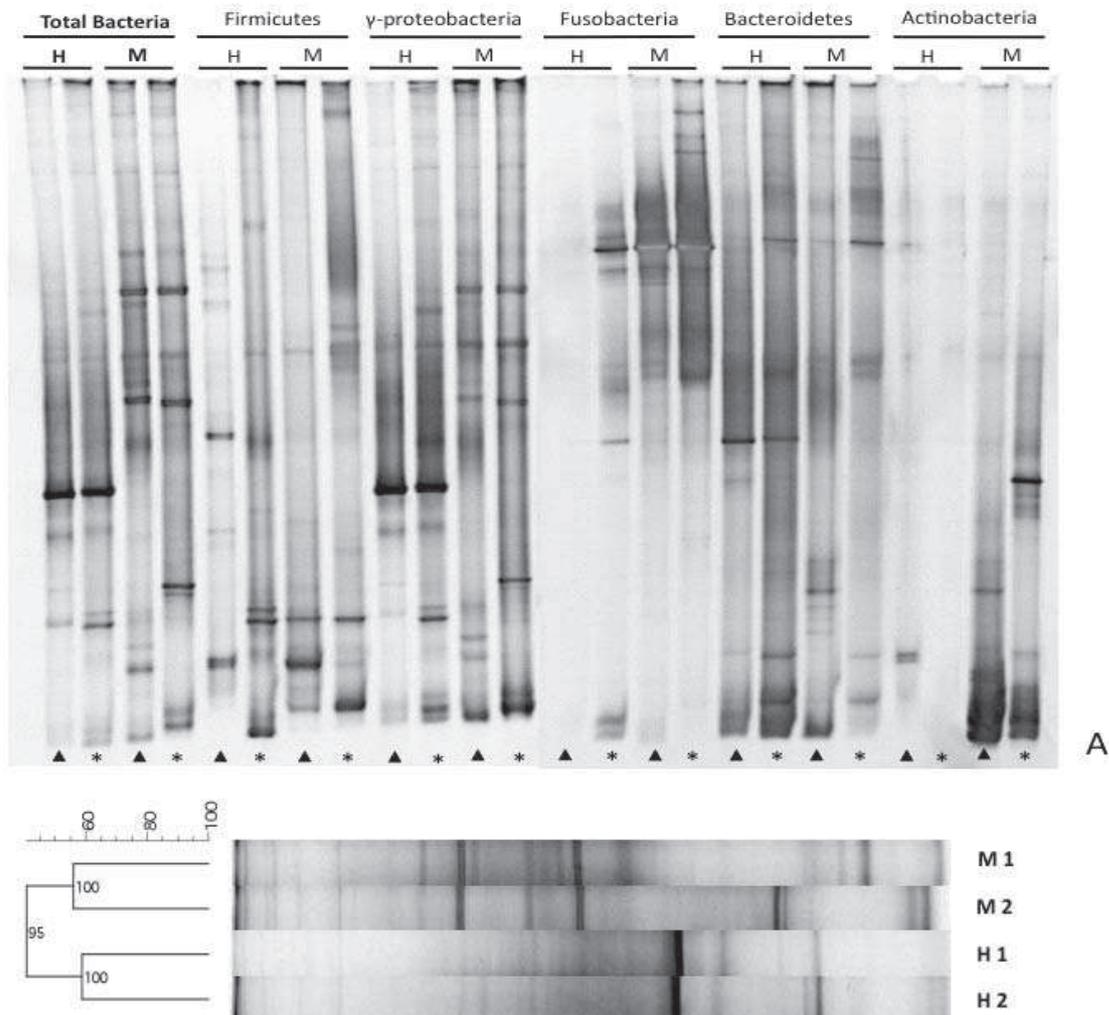
La literatura especializada destaca la importancia de *E. coli* y *Arcanobacterium pyogenes* como componentes críticos en el establecimiento de la metritis (Miller et al., 2007; Sheldon et al., 2010). Sin embargo, en nuestro estudio, las secuencias relacionadas con ambas bacterias no fueron detectadas en ninguna biblioteca. *E. coli* es aislada comúnmente en el postparto temprano (5 primeros días postparto) y se cree que favorece la infección de otras bacterias oportunistas, tales como *F. necrophorum*, *A. pyogenes*, y *Bacteroides* sp. (Dohmen et al., 2000; Sheldon et al., 2002). El muestreo para el presente estudio fue llevado a cabo al décimo día postparto y, además, nuestra definición de caso para metritis se restringió a las vacas que presentaban todos los signos clásicos de metritis según lo descrito por Sheldon et al. (2006). Nuestros hallazgos no disminuyen la importancia de ambas bacterias ya que *E. coli* se encuentra presente normalmente poco después del parto, y por otra parte, *A.*

pyogenes se encuentra presente en el ambiente intrauterino pasado el día 15 postparto. Se requiere más investigación para evaluar la sucesión microbiana de la microbiota intrauterina desde el parto hasta la resolución de la infección uterina.

El análisis DGGE para perfilado de grupos bacterianos específicos mostró similitudes ente las muestras de vacas que presentaban el mismo estatus pero de diferente ambiente (tambos). Además, el análisis de cluster del total de la comunidad bacteriana mostró que las muestras de vacas con el mismo estatus se reunían en un cluster, más allá de cual fuera el ambiente.

Debido a que las bacterias oportunistas y patógenas que causan metritis se originan del ambiente del tambo, es probable que este hecho esté asociado con meras similitudes en la microbiota natural que se da en tambos comerciales, donde las vacas están alojadas, o quizás un “corazón” microbiana mínimo sea determinante para definir salud y enfermedad. Se eligió el abordaje en nido, el cual facilita el análisis de poblaciones menores, debido a que el patrón final DGGE específico de grupo puede ser comparado directamente (considerando que hemos usado a la misma condición DGGE) con todos los otros

Figure 3. (A) Comparison of total and group-specific bacterial communities present in uteri of healthy [H] (n=5 cows from each farm) and metritic [M] (n=5 cows from each farm) Holstein postpartum dairy cows by nested PCR-DGGE.



B



patrones específicos de grupo, si en la segunda ronda se amplificó el mismo fragmento de gen 16S rARN.

Los nuevos conocimientos sobre la estructura, metabolismo y evolución de organismos no cultivados que ocupan diversos nichos traídos con el advenimiento de la metagenómica (Rondon et al., 2000; Handelsman, 2004), han urgido la necesidad de investigar la microbiota uterina dejando a un lado los métodos de cultivo. En años recientes, este mismo concepto ha sido usado ampliamente para investigar las conformaciones microbianas funcionales y genéticas en una variedad de ambientes tan complejos como el agua oceánica (DeLong et al., 2006), la tierra (Rondon et al., 2000), y el intestino humano (Turnbaugh et al., 2009). Para nuestro mejor conocimiento, este artículo describe el primer estudio independiente de cultivo que analiza la diversidad de poblaciones bacterianas presentes en el útero de vacas lecheras al postparto, saludables o con metritis. Tal como hemos observado, las conformaciones bacterianas fueron más similares entre muestras de vacas con el mismo estatus, sin importar el ambiente en el cual se encontraban. Mientras que el número de clones sometidos a screening no fue suficiente para sacar ninguna conclusión biológica, es importante enfatizar que el objetivo principal de este estudio fue el de investigar diferencias en la composición bacteriana en el útero de vacas lecheras al postparto y el impacto en la salud uterina, considerando la metritis, mediante el uso de

métodos independientes.

Nuestros datos mostraron que existe un cambio profundo en las bacterias presentes en los grupos con úteros sanos y con metritis, en sus abundancias absolutas y relativas. Somos conscientes de que nuestro trabajo recién está rascando al superficie del panorama microbiano del útero de las vacas lecheras, pero nuestra perspectiva es que los métodos integrados de alto rendimiento ayudarán a alcanzar un consenso y definir que es lo que constituye o determina una comunidad bacteriana patogénica en este síndrome. El continuar con la investigación de la diversidad y funcionalidad microbiana en este ambiente casi seguramente revelará complejas sintropías microbianas, sistemas de comunicación químico entre bacterias, y otras interacciones que ayudarán a explicar como interactúa la microbiota en el útero del hospedador para causar metritis y desórdenes reproductivos relacionados.

Este estudio mostró que la complejidad y conformación de la comunidad bacteriana intrauterina en las vacas lecheras al postparto difiere dramáticamente entre vacas sanas y vacas con metritis. Cinco grupos conocidos de bacterias y un grupo perteneciente a bacterias no cultivadas estuvo representado en las bibliotecas de clones de 16S ADN. *Fusobacteria* fue el grupo dominante en bibliotecas de clones de vacas con metritis y *Grammaproteobacteria* estuvo más presente en aquellas bibliotecas de vacas lecheras sanas.



Figura 4. Árbol filogenético de los grupos bacterianos identificados a partir de bibliotecas de clones a partir de de úteros de vacas Holstein al postparto sanas (n=10) y con metritis (n=10), mostrando sus afiliaciones. La historia de la evolución fue inferida usando el N

