



*TESIS DOCTORAL 2018*

# MICROBIOTA DEL TRACTO UROGENITAL DE CERDAS

BASES PARA EL DISEÑO DE  
SUPLEMENTOS VETERINARIOS CON  
MICROORGANISMOS AUTÓCTONOS  
PARA LA PREVENCIÓN DE  
INFECCIONES POSPARTO

**BIOQ. ANDREA TORRES LUQUE**





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 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



## **DEPARTAMENTO DE POSGRADO**

### AUTORIDADES:

#### DIRECTOR:

Dr. Sergio Enrique Pasteris

#### CONSEJO TITULAR:

Dra. Inés del Carmen Ramos

Dra. María Carolina Navarro

Dra. Maria Cristina Gaudio

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 BIOQUÍMICA

CARRERA DE DOCTORADO EN BIOQUÍMICA

Acreditado y Categorizado A ante la  
Comisión Nacional de Acreditación Universitaria (CONEAU)

Resolución nº: 732/00

Acreditado y Categorizado A ante la  
Comisión Nacional de Acreditación Universitaria (CONEAU)

Resolución nº: 489 - CONEAU – 12

**Director:**

Dr. Manuel Javier Aybar

**Comité Académico:**

Dra. Aida Ben Altabef

Dra. Gladis Susana Álvarez

Dra. Inés del Carmen Ramos

Dra. Roxana Beatriz Medina

Dr. Raúl Armando Salomón





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 TITULADO:

**“MICROBIOTA DEL TRACTO UROGENITAL DE CERDAS: BASES PARA EL DISEÑO  
DE SUPLEMENTOS VETERINARIOS CON MICROORGANISMOS AUTÓCTONOS  
PARA LA PREVENCIÓN DE INFECCIONES POSPARTO”**

TESISTA:

Bioq. Andrea Torres Luque

DIRECTORA:

Dra. María Claudia Otero

CODIRECTOR

Dr. Sergio E. Pasteris

COMISION DE SUPERVISION:

Dra. Clara del Valle Silva

Dra. Gloria Romina Ross

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



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

Parte de los resultados de este trabajo de tesis doctoral dieron lugar a las siguientes publicaciones:

#### **Artículos en revistas científicas con referato**

2017:-“ **Antimicrobial resistant *Escherichia coli* in the reproductive tract microbiota of cows and sows**” Torres Luque A., Gonzalez Moreno C., Pasteris S.E., Orden J.A., Ricardo de la Fuente R., Otero M.C. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. 55, 13–19.

2018:-“ **Reproductive management drives the composition of the microbial communities in urethra and vagina in healthy gilts and pregnant sows**” Torres Luque A., Fontana C., Pasteris S.E., Coconcelli P.S., Martín A.A., Otero M.C. Manuscrito en preparación.

#### **Presentaciones en Reuniones Científicas Internacionales**

2014- “**Microbiota autóctona del tracto urogenital de cerdas en sistemas de producción intensiva confinado y a campo de la region NOA**” Torres Luque, A; Martín, A.A; Pasteris, S.E; Correa Brito, L; Otero, M.C. VII Congreso de Producción Porcina del Mercosur, XII Congreso Nacional de Producción Porcina y XVIII Jornadas de Actualización Porcina. Mar del Plata, del 12 al 15 de Agosto.

2016-“**Autochthonous microbial populations from urogenital tract of gilts and pregnant sows. Isolation and characterization of native *Escherichia coli***”. Torres Luque, A., Gonzalez Moreno C., Martín, A.A.,Pasteris, S.E.,Otero, M.C. VII Congresso Internacional de Suinocultura. Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil, del 18 al 20 de octubre.


#### **Presentaciones en Reuniones Científicas Nacionales**


2015-“**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**”. Gonzalez Moreno C, Torres Luque A, Pasteris S.E, Orden JA, de la Fuente R, Otero MC. III Congreso de Bioquímicos del Litoral, XVI Jornadas Argentinas de Microbiología. Santa Fe, del 5 al 7 de Agosto.


2015-“***Escherichia coli* nativas del tracto reproductor bovino (trb) y porcino (trp): características asociadas a patogenicidad**”. Torres Luque A., Gonzalez Moreno, C., Pasteris S.E., Martin A.A., Cisint J.C., Otero M.C. III Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina y XXXII Jornadas Científicas de la Asociación de Biología de Tucumán. San Miguel de Tucumán, del 9 al 11 de Septiembre.


2017-“***Escherichia coli* del tracto urogenital (TUG) de cachorras y cerdas preñadas: conformación filogenética y propiedades asociadas a biofilm**” Torres Luque, A.; Pasteris, S.E.; Martin, A.A.; Otero, M.C. XXXIV Jornadas Científicas de la Asociación de Biología de Tucumán. Tafí del Valle, Tucumán, 26 y 27 de octubre.


## AGRADECIMIENTOS


 A mis directores de tesis la Dra. Ma. Claudia Otero y el Dr. Sergio E. Pasteris, por darme la oportunidad de crecer profesionalmente, por su dedicación, predisposición, por sus críticas siempre constructivas, por los consejos que ayudaron a mi formación. A Ustedes eternamente agradecida.


 A los integrantes de la Comisión de supervisión, la Dra. Clara Silva y la Dra. Romina Ross, por su predisposición, y el aporte generoso de sus conocimientos y experiencia.


 Al director de INSIBIO, Dr. Juan Carlos Diaz Ricci, por permitirme realizar mi trabajo de tesis en las instalaciones de esa institución.


 Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por la beca otorgada para llevar a cabo mis estudios de posgrado y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT) por el financiamiento de este trabajo.


 A los directores que pasaron por el Instituto de Biología de la FBQF: Dra Silvia Brunetti; Dra. Inés Ramos y Dr. Manuel Aybar por permitirme realizar mi trabajo de tesis en las instalaciones de esa institución.


 Al M.V. Alfredo Martín, por compartir sus conocimientos y tiempo, por su predisposición y ayuda desinteresada.


 A la Dra. Cecilia Fontana y al Dr. Pier Sandro Cocconcelli del Istituto di Microbiologia-Centro Ricerche Biotechnologiche de la Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza-Italia por su tiempo, generosidad, predisposición y ayuda.


 A Candelaria Gonzalez Moreno por su amistad y todos los momentos compartidos en este camino que estamos terminando juntas.

 A mis compañeros del Laboratorio de Ecología Microbiana y Sanidad Animal por todo lo bueno que hemos compartido, especialmente a: Virginia, Andreina, Coty, Lourdes y Emmanuel.

 A los becarios e investigadores del Instituto de Biología de la FBQF por su ayuda y buena predisposición. Especialmente a: Guille, Renato, Santi, Danchi, Belén, Daniela, Guada y Jorge.


 Al Dr. Mariano Aleman por su amistad y ayuda desinteresada.

 Al Dr. Pablo Valdecantos y Dra. Mariela Roldán por compartir sus conocimientos y estar siempre atentos.

 A la Dra. Ma. Teresa Ajmat por su ayuda y por compartir sus conocimientos.

 Dra. Natalia Habib y Dra. Estela Honoré por su predisposición y colaboración.

 A la Dra. Maria Jose Rodriguez Vaquero por su buena predisposición.

 A mis compañeros de la Cátedra de Biología por todos los buenos momentos compartidos y por acompañarme en este proceso: Fer, Ricardo, Ceci, Fede, José y Marce.

- 👤 Al M.V. Ramiro Rosa por su predisposición y ayuda desinteresada.
- 👤 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 facilitarme cepas de *Escherichia coli* utilizadas como controles en este trabajo de tesis.
- 👤 A los becarios del Instituto de Química Biológica de la FBQF por su desinteresada colaboración.
- 👤 Al personal de INSIBIO y FBQF, por su amabilidad.
- 👤 A todas mis amistades que de una manera u otra me ayudaron a cumplir mi reto profesional y personal, entendiendo mis ausencias y prestándome su oído.

*A Dios, por guiar cada uno de mis pasos. A mi familia por acompañarme y apoyarme siempre, entender mis ausencias y cuidarme, especialmente a mis padres y hermanos. A mi compañero de vida, mi esposo Javier, por su amistad, comprensión, apoyo, paciencia y ayuda durante todo este trayecto. Los amo! Gracias por ser incondicionales.*



## ÍNDICE

## INDICE

<b>ABREVIATURAS, SIGNOS Y SÍMBOLOS.....</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN / ABSTRACT.....</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>9</b>
I-Porcicultura.....	10
II- Producción porcina y consumo carne de cerdo .....	10
II.1 A nivel mundial .....	10
II.2 En nuestro país .....	11
III- Caracterización de los sistemas productivos porcinos.....	12
III.1 Sistemas extensivos o “a campo”.....	12
III.2 Sistemas intensivos o confinados.....	13
III.3 Sistemas mixtos.....	13
IV- Producción y manejo reproductivo.....	15
V- Causas que afectan la performance reproductiva de las cerdas .....	16
V.1 Anestro.....	17
V.2 Repeticiones de celo.....	17
V.3 Aborto.....	17
V.4 Descargas vulvares (DV).....	18
V.5 Mastitis y Síndrome de Disgalactia Posparto (SDPP).....	19
VI-Comunidades microbianas del tracto urogenital (TUG) de la cerda .....	21
VII. Alteraciones en la salud reproductiva de la cerda y performance de la camada: rol de <i>Escherichia coli</i> .....	22
VII. 1 Características de <i>Escherichia coli</i> patogénicas .....	22
VII.2 Uso de antibióticos en porcicultura. Resistencia antimicrobiana de <i>Escherichia coli</i> en sistemas porcinos .....	25
VIII. Estrategias alternativas para controlar las infecciones del tracto urogenital (TUG) porcino: Probióticos .....	27
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>32</b>
<b>I.Animales y toma de muestras .....</b>	<b>33</b>
I.1 Animales: categorías.....	33
I.2 Preparación de los animales: obtención de las muestras.....	33



I.3 Evaluación citológica de la mucosa vaginal del tracto urogenital (TUG). ....	35
<b>II. Estudio de las comunidades microbianas nativas de uretra y vagina porcina</b> .....	36
II.1 Análisis microbiológicos dependientes de cultivo.....	36
1.1 Medios para el aislamiento y cuantificación de microorganismos .....	36
1.2 Medios para subcultivo y crecimiento .....	37
1.3 Conservación de los microorganismos.....	37
II. 2 Identificación fenotípica parcial de la microbiota cultivable de tracto urogenital (TUG) porcino .....	37
II.3 Análisis microbiológicos independientes de cultivo.....	39
3.1 Extracción del ADN total de material de raspado de las mucosas uretral y vaginal .....	39
3.2 DGGE (Electroforesis en gel de poliacrilamida con gradiente desnaturizante).....	40
<b>III. Aislamiento y caracterización de <i>Escherichia coli</i> nativas de uretra y vagina porcina</b> .....	42
III.1 Aislamiento e identificación de <i>E. coli</i> .....	42
III.2 Caracterización de las poblaciones de <i>E. coli</i> nativas.....	42
2.1 Evaluación clonal: rep-PCR.....	42
2.2 Conformación filogenética.....	43
2.3 Evaluación de resistencia antimicrobiana.....	44
III.3 Evaluación de determinantes asociados a patogenicidad en <i>E. coli</i> nativas de uretra y vagina porcina.....	45
3.1 Movilidad.....	45
3.2 Presencia de Fimbria P y pili tipo I.....	45
3.3 Formación de Fimbria curli y/o celulosa.....	46
3.4 Formación de biofilm.....	46
3.5 Detección de genes asociados a factores de virulencia. ....	47
<b>IV. Aislamiento y caracterización de microorganismos potencialmente benéficos</b> .....	49
IV.1 Aislamiento de bacterias lácticas a partir de muestras vaginales y uretrales porcinas.....	49
IV.1.1 Aislamiento y conservación.....	49
IV.2 Análisis RAPD-PCR (Amplificación aleatoria de ADN polimórfico) .....	49
IV.3 Evaluación de la capacidad de síntesis de sustancias antimicrobianas.....	50
IV.3.1 Evaluación de la actividad antagónica (AA) .....	50

IV.3.2. Naturaleza química de la/las sustancia/s antimicrobiana/s que inhiben el crecimiento de <i>Escherichia coli</i> LEMSA 7736 .....	51
<b>V. Identificación genotípica de aislados seleccionados.....</b>	<b>52</b>
<b>VI. Análisis estadístico.....</b>	<b>53</b>
<b>CAPITULO 1: ESTUDIOS DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS AUTÓCTONAS DE VAGINA Y URETRA DE HEMBRAS EN DIFERENTES SITUACIONES DEL MANEJO REPRODUCTIVO .....</b>	<b>54</b>
1.1 Cerdas sanas: evaluaciones por vaginoscopía y citología de las mucosas del tracto urogenital (TUG) de cachorras y cerdas preñadas .....	55
1.2. Evaluación de la microbiota autóctona del tracto urogenital porcino (TUGP) mediante estudios microbiológicos dependientes de cultivos.....	56
1.2.1. Mesófilos totales en uretra (U) y vagina (V) porcina.....	56
1.2.2. Enterobacterias en uretra (U) y vagina (V) porcina .....	57
1.2.3. Relación enterobacterias y mesófilos totales .....	58
1.2.4. Vagina porcina: poblaciones microbianas nativas.....	59
1.3 Evaluación de la microbiota autóctona del tracto urogenital (TUG) porcino mediante estudios independientes de cultivos: Electroforesis en gel de poliacrilamida con gradiente desnaturizante (DGGE). .....	61
1.3.1 Estructura de las microbiotas residentes en las mucosas uretral y vaginal .....	61
1.3.2 Secuenciación de las bandas obtenidas en los perfiles de DGGE de las poblaciones del TUG de cachorras y cerdas preñadas .....	63
1.4. Cerdas enfermas: evaluación vaginoscópica y citológica de la mucosa vaginal .....	66
1.5 Cerdas enfermas: evaluación de la microbiota residente del tracto urogenital (TUG) mediante estudios microbiológicos dependientes de cultivos. ....	67
1.5.1 Mesófilos totales y enterobacterias uretra (U) y vagina (V) porcina . ....	67
1.6. Identificación de otras bacterias con potencial patógeno aisladas de cerdas enfermas	69
1.7. Discusión.....	70
1.8. Conclusiones Parciales.....	77
<b>CAPITULO 2: CARACTERIZACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> NATIVAS DEL TRACTO UROGENITAL (TUG) PORCINO.....</b>	<b>78</b>
2.1 . Prevalencia de <i>Escherichia coli</i> en vagina (V) y uretra (U) de cachorras y cerdas preñadas sanas y cerdas vacías enfermas .....	79
2.2. Análisis clonal de los aislados de <i>Escherichia coli</i> del tracto urogenital TUG porcino y su relación con el perfil clínico del hospedador.....	80

2.3. Estructura filogenética de las poblaciones de <i>Escherichia coli</i> autóctonas de uretra y vagina porcina.....	83
2.4. Perfil de resistencia a los antimicrobianos (RAM) de <i>Escherichia coli</i> autóctonas del tracto urogenital (TUG) porcino.....	84
2.5. Resistencia a los antimicrobianos (RAM) en los diferentes filogrupos que conforman las poblaciones nativas del tracto urogenital (TUG) porcino.....	87
2.6. Evaluación de determinantes de patogenicidad de <i>Escherichia coli</i> autóctonas del tracto urogenital TUG porcino.....	90
2.6.1 Factores asociados a adhesión y colonización .....	90
2.6.2 Detección de genes asociados a factores de virulencia .....	99
2.7. Discusión.....	103
2.8 Conclusiones parciales.....	112
<b>CAPITULO 3: BACTERIAS LÁCTICAS NATIVAS DEL TRACTO URIGENITAL (TUG) PORCINO: ACTIVIDAD ANTAGÓNICA (AA).....</b>	<b>113</b>
3.1. Bacterias lácticas presuntivas (BLp) en vagina y uretra de cerdas sanas y enfermas. ....	114
3.2. Perfil RAPD de los aislados de BLp (cocos y bacilos) nativas del tracto urogenital (TUG) de cachorras (CV) y cerdas preñadas (IA y SN) .....	116
3.3 Evaluación de la capacidad de síntesis de sustancias antimicrobianas .....	121
3.3.1 Expresión de actividad antagónica (AA) de las BLp nativas del tracto urogenital (TUG) porcino .....	121
3.3.2 Actividad inhibitoria de los sobrenadantes libre de células (SLC) de las BLp sobre <i>Escherichia coli</i> LEMSA 7736 .....	124
3.3.3 Identificación genotípica de LEMSA 5185 .....	125
3.4. Discusión.....	126
3.5. Conclusiones parciales.....	131
<b>CONCLUSIONES GENERALES y PROYECCIONES .....</b>	<b>132</b>
<b>CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>133</b>
<b>PROYECCIONES.....</b>	<b>134</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>135</b>





# **ABREVIATURAS, SIGLAS Y SIMBOLOS**

(p/v): peso en volumen

(v/v): volumen en volumen

°C: Grados Centígrados

µg: Microgramos

µM: Micromolar

µL: Microlitro

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADNr 16S: Ácido Desoxirribonucleico Ribosomal 16S

ALN: Agua libre de Nucleasas

AMC: Amoxicilina/Ácido Clavulánico.

AMP: Ampicilina.

APEC: *Escherichia coli* asociada a infecciones sistémicas en aves.

A.S: Agar sangre

ATB: Antibiótico.

bas: colonia marrón y lisa.

bdar: colonia marrón, seca y rugosa

BL: Bacteria láctica

BLp: Bacteria láctica presuntiva

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool.

BLEE: Betalactamasa de espectro extendido.

CAZ: Ceftazidima.

CIP: Ciprofloxacina

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria.

CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono.

CP: Coeficiente de Pearson.

c.s.p: cantidad suficiente para

CV: cachorra virgen.

DGGE: Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización.

DNP: días no productivos.

D.O.: Densidad Óptica.

DS: Desvío Estándar.

DV: Descarga vulvar.

E: cerda enferma.

*E. coli*: *Escherichia coli*.

Enpec: *Escherichia coli* Endometrio Patogénica Bovina.

ECEP: *E. coli* enteropatogénica

ECET: *E. coli* enterotoxigénica

ECPEx: *Escherichia coli* patógena extraintestinal.  
ECTS: *E. coli* productora de toxina Shiga  
ECUP: *Escherichia coli* Uropatógena  
FV: factor de virulencia.  
GR: glóbulos rojos.  
g: gramos.  
H<sub>2</sub>S: Ácido Sulfhídrico.  
h: horas.  
HCl: ácido clorhídrico.  
IA: Inseminación Artificial  
IEP: Intervalo entre partos.  
INTA-Leales: Instituto de Investigación Animal del Chaco Semiárido (INTA, Leales, Tucumán).  
IPC: Intervalo Parto-Concepción.  
IQ: Rango Intercuartil.  
IU: Infección Urinaria.  
L: Litro.  
LB: Luria Bertani.  
LPS: Lipopolisacárido.  
M: Molar.  
MC: Mac Conkey  
MDR: multi-droga resistente (multiresistente).  
MH: Agar Muller Hinton.  
min: Minutos.  
mL: Mililitro.  
mM: miliMolar.  
MPEC: *Escherichia coli* Patógena Mamaria.  
MSA: Manitol Salt Phenol-Red Agar  
NaCl: Cloruro de Sodio.  
NET: Entrampados Extracelulares de Neutrófilos.  
ng: nanogramos  
nm: nanómetro.  
NMEC: *Escherichia coli* Asociada A Meningitis Neonatal y Sepsis.  
Pb: Pares de bases.  
PBS: Solución Salina Bufferada con Fosfato.  
PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa.  
pdar: colonia rosa, seca y rugosa.

PMN: Neutrófilos Polimorfonucleares.  
PS: aglutinación positiva sensible a manosa.  
PR: aglutinación positiva resistente a manosa  
RAM: resistencia antimicrobiana  
RAPD: Amplificación aleatoria de ADN polimórfico.  
rdar: colonia roja, seca y rugosa  
RC: Rojo Congo  
RM: Rojo de Metilo.  
RU: Reino Unido  
S: Estreptomicina.  
s: Segundos  
saw : colonia lisa y blanca.  
SF: Solución Fisiológica.  
SLC: Sobrenadante libre de células  
SIM: Sulfuro de Hidrógeno-Indol-Movilidad.  
SN: Servicio natural  
TMS: Trimetoprima/Sulfametoxazol  
TE: Tetraciclina.  
TR: Tracto reproductor.  
TSI: Agar Hierro Triple Azúcar.  
TU: Tracto urinario  
TUG: Tracto Urogenital  
TUGP: Tracto Urogenital Porcino  
U: Uretra  
UFC: Unidades formadoras de colônias  
UPGMA: agrupación por pares no ponderado utilizando promedios  
USA: Estados Unidos  
UV: Ultravioleta  
V: Vagina  
VP: Voges-Proskauer.





## RESUMEN / ABSTRACT

## Resumen

Los sistemas pecuarios de cría intensiva generan condiciones que alteran el equilibrio de las microbiotas nativas y predisponen al desarrollo de infecciones; cuando ocurren en el tracto urogenital (TUG) de cerdas en posparto, comprometen la fertilidad futura de la madre y la performance de la camada reciente. Estos desequilibrios no fueron descritos aún en las categorías de hembras sanas que encontramos en un sistema tipo de producción porcina. Tampoco se conocen las características de *E. coli* con potencial patogénico en este tracto.

El objetivo de este trabajo de tesis fue caracterizar las poblaciones nativas del TUG porcino, con atención a potenciales *E. coli* patógenos y bacterias lácticas benéficas (BL), a fin de reconocer perfiles de riesgo sanitario y proponer microorganismos nativos como reconstituyentes que disminuyan el riesgo de infecciones posparto.

En este trabajo se estudió la composición de la microbiota vaginal y uretral de cerdas con trastornos reproductivos (E), cachorras (CV) y cerdas preñadas, por servicio natural (SN) y por inseminación artificial (IA); las diferencias encontradas (por cultivos y/o PCR-DGGE) se asocian al perfil clínico y al protocolo de manejo reproductivo. Por primera vez, se describen *E. coli* nativas en uretra de cachorras y cerdas preñadas sanas; siendo más prevalentes que en vagina. Ambas poblaciones mostraron elevada similaridad genética, superior al 80% (ERIC-PCR, BOX-PCR). Sin embargo, la conformación filogenética incluyó los grupos A, B1 y D pero no B2, encontrándose B1 exclusivamente en uretra.

Se caracterizaron 50 aislados de *E. coli* del TUG en cuanto a resistencia a antimicrobianos y potencial patogénico (genes y expresión de factores asociados a virulencia). La mayor resistencia fue a tetraciclina y ampicilina, el 20% mostró resistencia al menos a tres clases de antibióticos. La evaluación de expresión de características relacionadas a patogenicidad y de presencia de 14 genes asociados a *E. coli* patógenos extraintestinales mostró que existe correspondencia con perfil clínico y manejo reproductivo. Se destaca *E. coli* LEMSA 7736, de uretra de cerda del grupo E, que resultó positiva para el receptor del sideróforo yersiniabactina (*fyuA*), fimbria P (*papAH*), hemolisina (*hlyA*), protectina (*traT*), factor asociado a biofilm (*agn 43*), pili tipo I (*fimH*) y subunidad A de fimbria curli (*csgA*), la que expresó en un medio diferencial.

Del estudio de las BL, como poblaciones potencialmente benéficas del TUG, se observó que su contribución a la microbiota dependió de la situación reproductiva de la hembra. Cocos prevalecieron sobre bacilos y las BL de cada nicho (uretra-vagina) presentaron elevada similaridad genética (perfiles RAPD). La mayor actividad antimicrobiana frente a patógenos del TUG porcino se detectó en los cocos lácticos, el

33% se debió a una probable sustancia peptídica (sensible a tripsina) con actividad frente a patógenos Gram (+) y Gram (-) como *E. coli* LEMSA 7736.

Los resultados de este trabajo sientan bases para establecer criterios de monitoreo del estado sanitario del TUG en cerdas y su mejoramiento a través de la reconstitución de las microbiotas nativas con BL autóctonas potencialmente benéficas. Asimismo proponer protocolos de manejo para mejorar la performance de las madres y sus camadas.

Palabras clave: MICROBIOTA      TRACTO UROGENITAL      CERDA

## Abstract

Intensive livestock production systems conditions frequently compromised native microbiotas homeostasis and predispose infections. When these infections occur in the urogenital tract (UGT) of postpartum sows, they compromise the future fertility of the mother as well as the performance of the litter. These imbalances have not been previously described in female categories typically found in porcine farms. The virulence profile of *E. coli* with pathogenic potential in UGT of sows are also unknown.

The objective of this thesis was to characterize the native populations of the porcine UGT, focusing on potentially pathogenic *E. coli* to identify sanitary risk profiles and beneficial lactic bacteria (LB), to propose native microorganism like restoratives to minimize postpartum infections.

In this work we studied the vaginal and urethral microbiota composition of sows with reproductive problems (E), gilts (G) and pregnant sows by natural mating (NM) or artificial insemination (AI). The differences found (by culture and/or PCR-DGGE) depended on the clinical profile and reproductive management of the animals. This thesis describes, for the first time, the isolation of native *E. coli* from urethra of gilts and healthy pregnant sows and they were more prevalent than in the vagina. Both populations showed a high genetic similarity, of more than 80% (ERIC-PCR, BOX-PCR). However, the phylogenetic conformation involved A, B1 and D groups but not B2. It is interesting to point out that B1 was found exclusively in urethra.

Fifty *E. coli* isolates from the UGT were characterized in terms of antimicrobial resistance and pathogenic potential (genes and expression of virulence related factors). The highest resistance was to tetracycline and ampicillin and 20% of the isolates showed resistance to at least three classes of antibiotics. The expression of characteristics related to pathogenicity and the presence of 14 genes associated with extraintestinal pathogenic *E. coli* showed correspondence with the clinical profile and reproductive management. *E. coli* LEMSA 7736, isolated from urethra of a sow from group E was positive for the siderophore receptor yersiniabactin (*fyuA*), fimbria P (*papAH*), hemolysin (*hlyA*), protectin (*traT*), biofilm related factor (*agn 43*), type 1 fimbriae (*fimH*) and subunit A from curli fimbriae (*csgA*), which was expressed in a differential medium.

The study of LB as a potentially beneficial population from UGT showed that its contribution to the microbiota depended on the female reproductive status. Cocci prevailed over rods and the LB from both niches (urethra-vagina) showed high genetic similarity (RAPD profiles). The highest antimicrobial activity against swine UGT pathogens was detected in lactic cocci, 33% was due to a probable peptide substance

(sensitive to trypsin) with activity against Gram (+) and Gram (-) pathogens such as *E. coli* LEMSA 7736.

The results from this work laid the foundation for establishing criteria for monitoring the health status of UGT in sows and its improvement through the reconstitution of their native microbiota with potentially beneficial autochthonous LB. In the same way, suggest management protocols to improve the performance of mothers and their litters.

Keywords: MICROBIOTA      UROGENITAL TRACT      SOW



# INTRODUCCIÓN

## I-Porcicultura

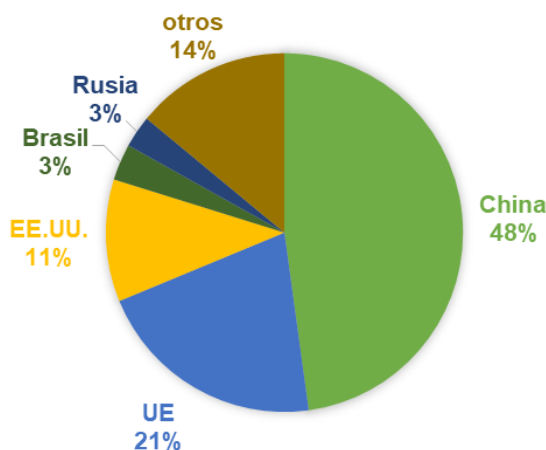
La porcicultura se define como la cría y reproducción de los cerdos, pudiendo tener como finalidad el abastecimiento familiar y/o la comercialización de los animales o sus derivados que incluyen carne fresca, embutidos y chacinados.

## II- Producción porcina y consumo carne de cerdo

### II.1 A nivel mundial

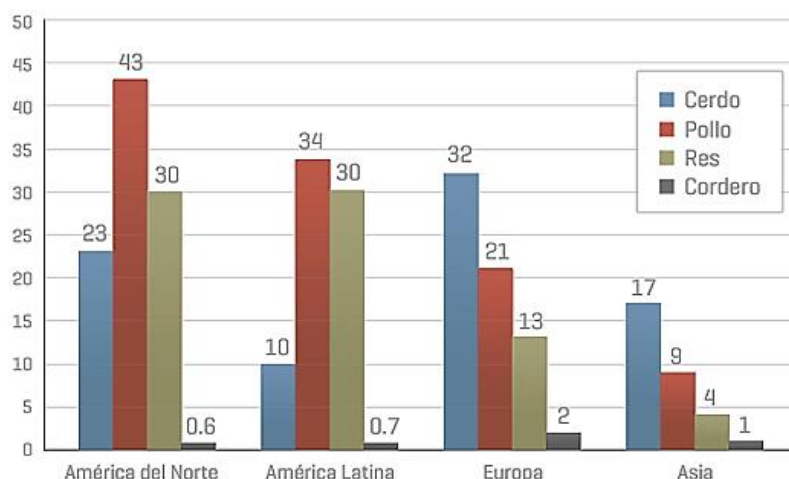
Los principales productores y consumidores de cerdo a nivel mundial son China, países miembros de la Unión Europea y Estados Unidos, siendo responsables de más del 85% de la producción mundial, lo que equivale a 1.115 millones de cabezas. Del resto de los países los que se destacan son Brasil y Rusia, que suman 84 millones de cabezas según las estadísticas más recientes (USDA, 2018) (**Fig. 1**).

Excepto Brasil, los países latinoamericanos tienen una industria porcina poco desarrollada y generalmente ineficiente, principalmente debido a que los consumidores residentes prefieren tradicionalmente la carne vacuna. Sin embargo en los últimos años, el aumento de los precios de la misma ayudó a incrementar la popularidad de la carne de cerdo (Kuberka, 2018).



**Figura 1: Distribución de la producción mundial de carne de cerdo.** Elaboración propia en base a datos de USDA 2018.

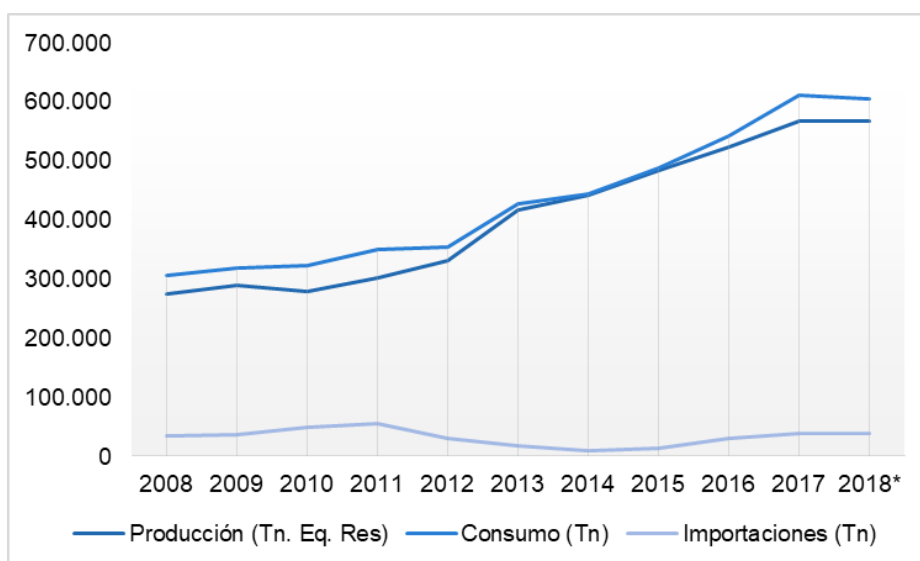
De acuerdo a estudios realizados por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), “la carne roja de mayor consumo mundial es la carne de cerdo, cuya demanda en las últimas décadas ha experimentado un fuerte incremento”. De hecho en 2016 el 40% del total de carne consumida a nivel global correspondió a carne de cerdo. Esta, junto con la carne de pollo, es utilizada como fuente de proteínas en las dietas de diferentes países en el mundo, con unas pocas excepciones (**Fig. 2**)



**Figura 2: Dieta carnívora a nivel mundial.** Consumo anual en Kilogramos per capita. Fuente: FAO

## II.2 En nuestro país

Las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe son las principales productoras de carne de cerdo, representando el 75% de la producción nacional (Anuario Porcinos, 2017), mientras que su consumo es muy diferente al mundial. Según datos de la Asociación Argentina de Productores de Porcinos, en nuestro país el consumo de carne porcina se ha visto incrementado, a tal punto que los valores se han triplicado con respecto al consumo registrado hace 15 años (**Fig. 3**). En 2017 se ha informado un record de 14 Kg/habitante/año, que se reparten en 11 Kg de carne fresca y 3 Kg de fiambres y chacinados (Calzada y col., 2018).



**Figura 3: Producción y consumo de carne de cerdo en Argentina.** \*hasta el mes de noviembre. En base a datos del Área Porcinos, Dirección Porcinos, Aves de Granja y No Tradicionales en base a datos de SENASA, Gestión de la Información – D.N. de Matriculación y fiscalización e INDEC. Tn: toneladas. Tn. Eq. Res.: equivalente en toneladas de res.



Con respecto a la producción de cerdos en la provincia de Tucumán esta representa solamente el 0,3% de la producción nacional, lo que equivale a 17.100 cerdos enviados a faena (Anuario Porcinos, 2017). Cabe destacar que estos datos son sólo de aquellos productores que constan en el Registro Nacional Sanitario de Productores Pecuarios (RENSPA). Sin embargo existe un alto porcentaje de **pequeños establecimientos** que destinan su producción al autoconsumo o al circuito comercial informal que no se encuentran registrados (IDEP-INTA 2013). Estos sistemas productivos se caracterizan por desarrollarse al aire libre, a campo, utilizando principalmente la mano de obra familiar. Tienen recursos limitados (animales, alimentación, instalaciones, entre otros) y, por lo general, el cerdo es parte de un sistema diversificado donde el mismo productor y su familia deben repartir su tiempo entre las tareas destinadas a los cultivos, el manejo de los otros animales de granja y los quehaceres diarios del hogar. Estas condiciones hacen que la cría porcina a nivel de los pequeños productores sea ineficiente desde el punto de vista productivo y que la problemática a abordar sea compleja (Macedo, 2017).

La actividad porcina en Tucumán se desarrolla principalmente en el este de la provincia debido a que en esa zona se concentra la producción de granos, principal alimento en porcicultura. Más del 65% de la actividad productiva porcina se concentra en los departamentos de Burruyacú, Leales, Trancas y Cruz Alta (IDEP-INTA 2013).

### III- Caracterización de los sistemas productivos porcinos

Al apreciar el diseño de las instalaciones, el manejo de la alimentación y los aspectos reproductivos, se hace evidente la diversidad de modelos de producción y cría; sin embargo se pueden clasificar en 3 grandes grupos: **extensivo o “a campo”, intensivos o confinados y mixtos** (combinación de los anteriores).

#### III.1 Sistemas extensivos o “a campo”

En este sistema de cría los animales viven sueltos o dentro de corrales al aire libre con instalaciones sencillas y de bajo costo que pueden incluir un techo que les proporciona sombra, comederos, bebederos y parideras. Se caracteriza por su baja inversión inicial, bajo número de animales/m<sup>2</sup>, utilización de mano de obra familiar y baja productividad, ya que las pariciones se producen sin control del ambiente y con poca intervención del hombre, por lo que el número de lechones destetados es bajo. La alimentación, en el mejor de los casos, incluye maíz, subproductos de la soja (como pellet, expellet), hortalizas de estación y las pasturas disponibles en el lugar. Los animales son de tipo criollo o cruza (**Fig. 4 A y B**).

### III.2 Sistemas intensivos o confinados

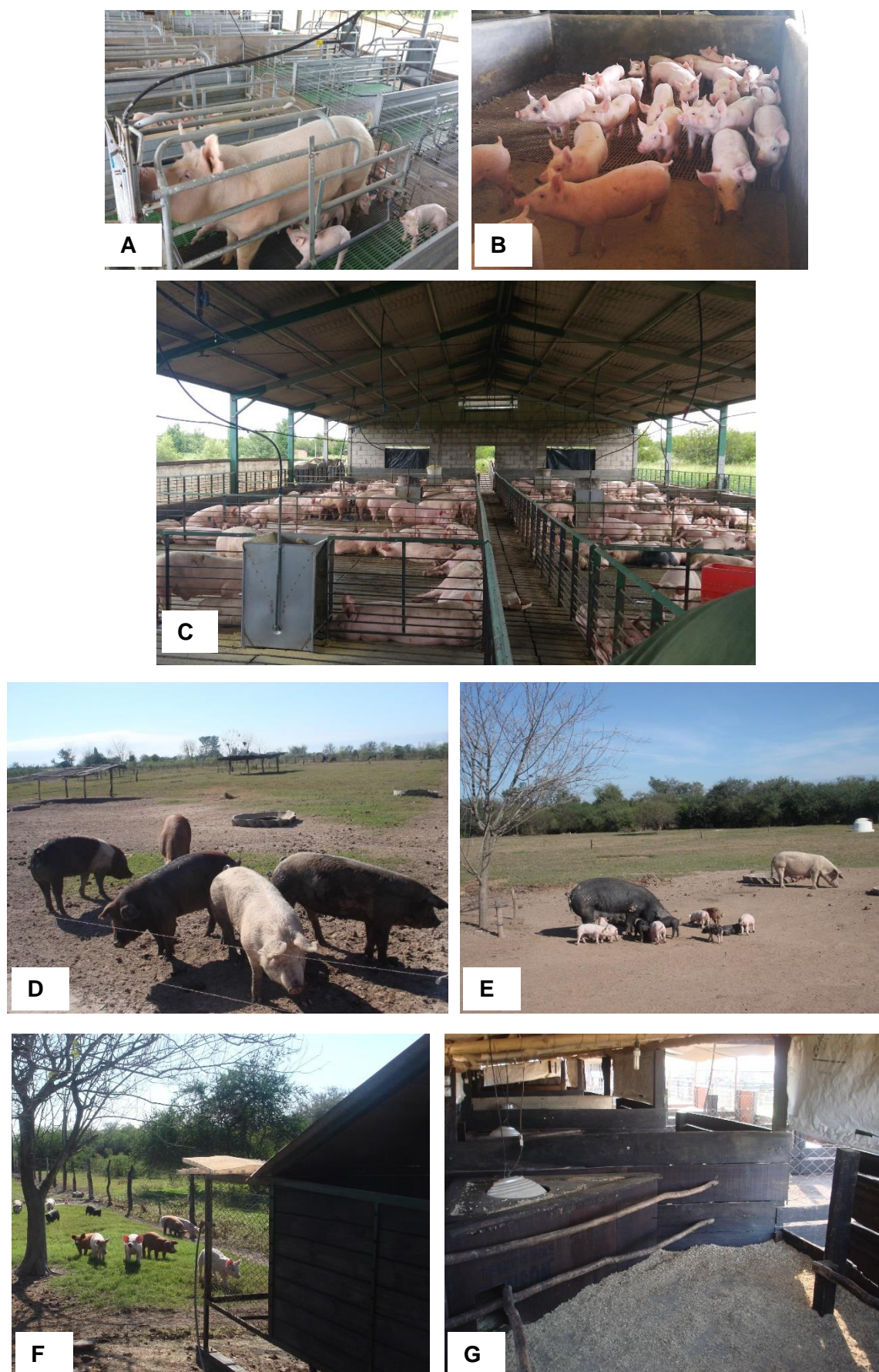
En los sistemas confinados los animales se crían en corrales techados, generalmente con piso de cemento, que se adecuan según la etapa de desarrollo. Se caracteriza por su alta inversión inicial, alto número de animales/m<sup>2</sup>, mano de obra asalariada y mayor productividad. La alimentación es en base a alimento balanceado donde las raciones son estrictamente controladas. Se sigue un plan sanitario estricto con manejos reproductivos programados en los que suelen utilizarse reproductores de alto valor genético (**Fig. 4 C y D**).

### III.3 Sistemas mixtos

Hay establecimientos que combinan características de los sistemas “a campo” y confinados, por lo que se denominan sistemas mixtos. Se caracterizan por el acceso a pasturas de los animales, lo que les permite incorporar factores nutricionales no disponibles en los alimentos balanceados, ejercitar la musculatura y exponerse a la luz solar. Las instalaciones van desde corrales con refugios sencillos hasta galpones de confinamiento con acceso controlado a pasturas durante varias horas al día. Poseen un sector destinado a maternidad donde se trasladan las cerdas un tiempo antes de parir y en donde permanecen junto a los lechones hasta el destete (**Fig. 4 F y G**).

En la provincia de Tucumán, la porcicultura es una actividad realizada principalmente a nivel familiar, con sistemas de cría de tipo extensivo o mixto y, en menor medida, sistemas confinados (IDEP-INTA 2013).

Existen emprendimientos con sistemas de ciclo completo (nacimiento a faena), donde la mayor parte de las etapas se realizan a través del sistema extensivo y en otros se confinan algunas de ellas.



**Figura 4. Sistemas de producción porcina. A, B y C Sistema intensivo. D y E Sistema extensivo o “a campo”. F y G Sistema mixto. A) Sector maternidad, parideras; B) sector re-cría; C) sector de engorde; D) sector de engorde; E) sector maternidad; F) sector re-cría; G) sector maternidad, parideras.**

#### IV- Producción y manejo reproductivo

La producción de carne de cerdo tiene una serie de ventajas frente a la producción de carne de otras especies ganaderas. Así por ejemplo, la actividad porcina se caracteriza en general por su alta producción de carne en un período de tiempo menor al de otras especies, tienen un menor período de gestación, una cantidad superior de pariciones por madre, menor tiempo de engorde y mayor eficiencia en la conversión de alimento en carne.

La productividad en un establecimiento porcicultor depende directamente de la eficiencia reproductiva de sus madres que puede medirse como:

- Número de lechones destetados/cerda.
- Kg de lechones destetados/cerda.
- Camadas/cerda/año.

Otro parámetro que suele usarse para medir la productividad a nivel establecimiento es la tasa de parto, que se calcula como  $N^{\circ}$  de cerdas paridas/ $N^{\circ}$  de cerdas cubiertas (Jabif, 2013).

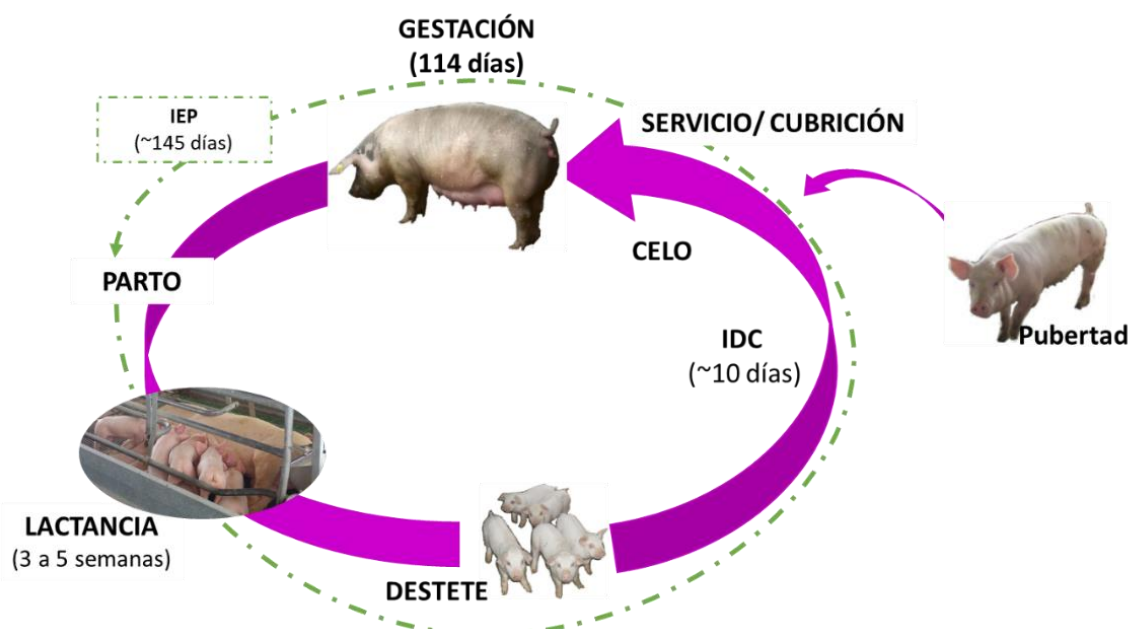
En otras palabras la productividad estará dada por el desempeño reproductivo de las cerdas luego de ser cubiertas o servidas (ya sea por monta/servicio natural o por inseminación artificial), ya que no siempre todas llegan al parto, y las que lo hacen pueden tener resultados variables en cuanto a número de lechones nacidos vivos, número de lechones destetados y el peso de estos al nacer y ser destetados.

La cerda doméstica es un animal poliéstrico continuo, tiene su ciclo estral cada 21 ( $\pm$  3) días y un período de gestación de 114 días (Bertoldo y col., 2012; Kirkwood y col., 2012) (**Fig. 5**). El ciclo sexual de la cerda se divide en dos fases: folicular y luteal y en cuatro etapas: proestro, estro, metaestro y diestro. La fase folicular implica al proestro y al estro, mientras que la fase luteal comprende al metaestro y diestro. El proestro (~ 2 días) es el periodo de crecimiento folicular y aumento de la producción de estrógenos; el estro (2-3 días) es el periodo de maduración de los folículos y ovulación en el que la hembra se presenta receptiva al macho (celo); el metaestro (~2 días) es el periodo de generación de cuerpos hemorrágicos y comienzo de la secreción de progesterona; el diestro (~15 días) es el periodo de formación de cuerpos lúteos y pico máximo de progesterona (Quiles y Hevia, 2012).

Para que la productividad del establecimiento porcicultor sea óptima, el **intervalo entre partos** (IEP) no debe superar los 145 días, es decir una hembra debe tener al menos 2 partos por año (**Fig. 5**). En un establecimiento porcicultor los días en que la cerda está gestando o lactando son los días productivos, mientras que el resto representan los **días no productivos** (DNP). Se denominan cerdas vacías a aquellas que no están gestando ni criando una camada y, por lo tanto, son improductivas (Jabif, 2013). El incremento de los

DNP lleva a una disminución de la eficiencia reproductiva y, por lo tanto, a pérdidas económicas.

Los días productivos dependen de la fisiología (gestación) y del manejo del destete por el porcicultor (duración de la lactación) manteniéndose relativamente constantes dentro de cada sistema de cría, por lo que la productividad dependerá principalmente de los DNP.



**Figura 5: Ciclo productivo de las cerdas** En base a: Reproducción rentable en porcinos. Cuaderno de campo Ivomec. IEP: Intervalo Entre Partos; IDC: Intervalo Destete Cubrición

Cuando los DNP se extienden, el productor procede al descarte de las cerdas. Las causas más comunes del descarte voluntario o planificado son edad avanzada, rendimiento inadecuado, baja productividad (poca cantidad de lechones nacidos vivos y destetados), progenie pobre y/o poca producción de leche. El sacrificio voluntario permite la minimización de DNP y una mejor planificación de la introducción de cachorras de reemplazo (Stalder y col., 2012). La eliminación involuntaria o no planificada se refiere a otras causas en las cuales el productor no tiene tanto control, como ser problemas locomotrices y reproductivos.

## V- Causas que afectan la performance reproductiva de las cerdas

Las fallas reproductivas incluyen una variedad de causas: falta de detección del primer celo y del estro posdestete, repeticiones de celo, diagnóstico negativo de preñez, fallas en el parto, aborto y descargas vulvares (DV). La falla reproductiva es la principal razón para el sacrificio de las cerdas, representando entre el 13 y el 49% de todos los descartes (Stalder y col., 2012).



### V.1 Anestro

El anestro es la ausencia de celo detectable y puede ser fisiológico (durante la gestación y la lactancia) o patológico (Safranski y Cox, 2007; Soede y col., 2011). El anestro patológico es una de las causas de descarte más común en cerdas de menos de 2 partos. La falta de celo se manifiesta productivamente con un aumento del intervalo destete-celo o falta del celo posdestete en cerdas primíparas y pluríparas (Almond y col., 2007; Barrales y col., 2016; Koketsu y col., 2017). Los principales factores causales de anestro son: fallas nutricionales, elevadas temperaturas, intoxicación con micotoxinas, quistes ováricos y estado sanitario deficiente (Vargas y col., 2009; Barrales y col., 2016; Koketsu y col., 2017).

### V.2 Repeticiones de celo

Se habla de repetición de celo cuando una cerda que fue servida manifiesta nuevamente celo. Las repeticiones de celo pueden ser básicamente regulares o irregulares. El retorno regular se observa cuando no hubo concepción o se produjo muerte embrionaria (antes de los 18 días de gestación) que deja viables menos de cuatro embriones. Este lleva a que no se produzca el **reconocimiento materno de la preñez (RM)** por lo que la cerda retornará al celo a los  $21 \pm 3$  días (Rutter y Russo, 2002; Almond y col., 2006; Kirkwood y col., 2012). Cuando el retorno al celo ocurre luego del RM se denomina irregular y el celo se manifiesta entre los 25 y 39 días luego del servicio. Los retornos regulares se producen, generalmente, por condiciones de manejo, mientras que la principal causa de retorno irregular es de origen infeccioso (Almond y col., 2006; Barrales y col., 2016).

### V.3 Aborto

La muerte uterina de los fetos puede ocurrir en cualquier etapa de la gestación. Una tasa de abortos inferior al 2% es considerada aceptable en la mayoría de los criaderos y cuando ésta se incrementa suele deberse a un agente infeccioso (Floss y Tubbs, 1993). Modificaciones del ambiente uterino durante la gestación, producto de infecciones (que afecten a la cerda o directamente a los fetos) pueden derivar en la pérdida de uno, varios o todos los fetos de la camada. Si la infección ocurre antes de los 35 días de gestación los fetos son reabsorbidos, pero si ocurre luego de comenzada la calcificación de los embriones (aproximadamente día 40 de gestación) pero antes de los 70 días, los fetos no pueden ser reabsorbidos sino que se momifican. Si la infección ocurre después del día 70, los lechones nacen muy débiles o muertos (Floss y Tubbs, 1993; Jabif, 2013). Dentro de las causas de aborto, las infecciosas se asocian a patógenos bacterianos como *Brucella suis*, *Leptospira interrogans* y *Erysipelothrix rhusiopathiae*, así como a agentes virales entre los que se destaca el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV) (Kirkwood y col., 2012; Barrales y col., 2016). Es importante destacar que las infecciones abortivas afectan fuertemente la producción de un establecimiento.

#### V.4 Descargas vulvares (DV)

Algunas DV son indicativas de eventos fisiológicos normales mientras que otras son patológicas pudiendo interferir con la fertilidad y la concepción de la hembra. Las DV anormales pueden provenir de los diferentes órganos que forman el **tracto urogenital** (TUG): vagina, útero, vejiga o riñones (Kirkwood y col., 2012). Dentro de las DV normales se encuentran las observadas durante: el celo (secreción escasa, serosa, transparente y filante), las últimas 2-3 semanas de gestación (secreción mucopurulenta escasa, asociada con la producción de moco y los cambios celulares en las membranas vulvovaginales) y después del parto (DV sanguinolenta que contiene restos placentarios y del endometrio), la que desaparece dentro de los 2 días post parto (de Winter y col., 1995; Kirkwood y col., 2012).

La presencia de DV purulenta durante 10 o más días es indicativa de metritis o endometritis y se presentan con mayor frecuencia durante el posparto o en el período postservicio. Esto se debe a que en estos períodos, el útero se encuentra bajo la influencia de la progesterona (P4) que induce inmunosupresión en el endometrio, lo que predispone a infecciones (Almond y col., 2006; Barrales y col., 2016).

La endometritis postservicio está relacionada con la mala higiene de la vulva, del prepucio de los padrillos y de los elementos de inseminación artificial (Barrales y col., 2016), mientras que la endometritis después del parto también ocurre como resultado de distocia, lesión traumática, aborto y manipulaciones antihigiénicas. Finalmente la endometritis inespecífica resulta de la infección por bacterias consideradas como patógenos oportunistas, no específicos del tracto reproductivo, entre los que se destacan *Escherichia coli*, *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Arcanobacterium pyogenes*, *Proteus* sp., *Klebsiella* sp. (Kirkwood y col., 2012). Está descrito que hay una mayor probabilidad de infertilidad posterior al parto en las cerdas que tienen secreción vulvar prolongada después del mismo (Waller y col., 2002; Kirkwood y col., 2012).

Una DV purulenta, con o sin sangrado, puede ocurrir en casos de **infecciones del tracto urinario** (ITU) como es el caso de la cistitis o de la pielonefritis. Esta descarga generalmente contiene mucosidad y se asocia con la micción apareciendo al final de la misma, sin estar relacionada con el estado hormonal (Kirkwood y col., 2012). Las ITU son una de las causas más comunes y no identificadas de muerte súbita o DV en cerdas, y se ha establecido una correlación significativa entre infecciones urinarias, genitales y mamarias en cerdas lactantes (Wanyoike y Bilkei, 2006). La pielonefritis es una enfermedad grave que causa un menor bienestar animal y considerables pérdidas económicas debido a la morbilidad y a la mortalidad (Wanyoike y Bilkei, 2006; Isling y col., 2010). Las ITU son una de las principales causas de fallas reproductivas, complicaciones generales de salud y reducción de la esperanza de vida del rebaño porcino (Giroto y col., 2000, Pôrto y col., 2004; Mazutii y col., 2013). Muchos casos de ITU son asintomáticos y sub-diagnosticados ya

que se detectan solo al examinar la orina; otros suelen ser afebriles y pueden mostrar anorexia, hematuria y piuria, mientras que en los casos agudos y graves se produce la muerte súbita, probablemente por insuficiencia renal aguda. (Drolet, 2012). Los microorganismos más frecuentemente encontrados en estas infecciones son *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Aeromonas hydrophila* y *Actinobaculum suis* (Sobestiansky, 2007; Menin y col., 2008; Isling y col., 2010).

El confinamiento de las cerdas gestantes parece influir en la mayor incidencia de ITU en las mismas, debido a la disponibilidad reducida de agua, la contaminación fecal del área perineal, el aumento excesivo de peso y las lesiones en las piernas, lo que resulta en una reducción en la frecuencia de micción favoreciendo el establecimiento de potenciales patógenos en el TUG (Drolet, 2012).

Se ha demostrado que todas las enfermedades TUG afectan el rendimiento reproductivo de las cerdas así como la salud y el potencial de crecimiento de sus crías (Waller y col., 2002).

### **V.5 Mastitis y Síndrome de Disgalactia Posparto (SDPP)**

La mastitis es el término con el que se conocen las infecciones de las glándulas mamarias, que se caracterizan por presentar inflamación, edema, congestión de la piel con fiebre ( $> 40,3 - 40,5^{\circ}\text{C}$ ), y se acompaña de anorexia (Van Gelder y Bilkei, 2005). La mastitis puede afectar glándulas mamarias individuales, múltiples o todas. Las bacterias que se aíslan con mayor frecuencia de las cerdas afectadas por mastitis son microorganismos Gram negativos (*E. coli*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Klebsiella*) (Klopfenstein y col., 2006). Esta infección suele ocurrir en los primeros 3 días postparto, llevando rápidamente a la inanición de los lechones (Martineau y col., 2012). Creo que todos los coliformes son Gram negativos

El término síndrome de Mastitis Metritis Agalactia (MMA) se usa comúnmente en países europeos y en la literatura, pero es engañoso ya que la metritis solo se encuentra ocasionalmente en las cerdas afectadas. Además, en lugar de mostrar agalactia total, las cerdas generalmente continúan produciendo leche pero a un nivel reducido. El síndrome MMA debe considerarse una forma grave de SDPP, aunque el límite entre SDPP y MMA no está bien definido (Martineau y col., 2012).

El SDPP ocurre cuando los lechones tienen signos de retraso en el crecimiento o inanición, pero las glándulas mamarias en sí no se ven afectadas. Este síndrome se caracteriza por la producción insuficiente de calostro y leche durante los primeros días después del parto. Las consecuencias de SDPP dependen de su gravedad. Los casos agudos con signos clínicos en las cerdas conducen a una alta mortalidad en lechones, mientras que el SDPP sin signos en las cerdas conduce "solo" al crecimiento deficiente de



los lechones durante el período neonatal (Foisnet y col., 2010), estos últimos a veces denominados "camadas problemáticas".

La fisiopatología de SDPP aún no se ha dilucidado completamente, y es poco probable que exista un solo mecanismo que lo provoque. Hay al menos tres mecanismos diferentes en relación con la lactogénesis y la galactopoyesis implicados en la aparición del SDPP. Uno de los mecanismos está mediado por endotoxinas y actúa a través del sistema inmune innato, otro está mediado por el estrés y el último está relacionado con la proporción de grasa y músculo en la cerda (ya sea, cerdas gordas o cerdas muy magras). En el caso del mecanismo mediado por endotoxinas, se vio en cerdas constipadas o con alguna infección como ser mastitis, metritis o cistitis (Martineau y col., 2012).

## VI- Comunidades microbianas del tracto urogenital (TUG) de la cerda

Se conoce como microbiota a la comunidad de microorganismos que convive en un determinado nicho anatómico en un momento determinado (Schneeweiss y col., 2016).

La microbiota autóctona de tractos y mucosas de animales está constituida por diversas poblaciones microbianas en permanente interacción, mutua y con el hospedador, que en condiciones fisiológicas mantienen el equilibrio ecológico, modulan el sistema inmune y previenen el desarrollo de infecciones (Saulnier y col., 2011).

Las mucosas de los mamíferos recién nacidos son colonizadas rápidamente por microorganismos provenientes de la microbiota de la madre y del medio ambiente que los rodea, pudiendo permanecer allí durante toda la vida del animal (Gyles y Fairbrother, 2010). Se ha demostrado la especificidad de nicho ecológico mediada por la expresión de genes que les permiten adaptarse y colonizar (O'Sullivan y col., 2009). Numerosos estudios han descrito las microbiotas de vagina tanto de humanos como de diferentes especies de animales, entre ellas la porcina (Bara y col., 1993; Gajer y col., 2012; Lorenzen y col., 2015b; Gonzalez Moreno y col., 2016; Wang y col., 2017) y, más recientemente, también se han evaluado las comunidades microbianas que residen en el tracto urinario, antes considerado un nicho estéril (Siddiqui y col., 2011; Thomas-White, 2016; Burton y col., 2017).

El equilibrio ecológico puede afectarse por factores extrínsecos o intrínsecos, permitiendo el sobre-crecimiento de poblaciones potencialmente patógenas, o bien el ingreso de patógenos que causan enfermedad. Cuando estos desequilibrios o disbiosis ocurren en el tracto reproductor de hembras de algunas especies animales e involucran a *E. coli*, pueden inducir cambios hormonales en detrimento de la fertilidad (Jaiswal y col., 2009; Sheldon y col., 2009; Marcus y col., 2012).

En 2016, Stapleton informó que la microbiota vaginal es clave en la patogénesis de las ITU en mujeres, pudiendo servir como reservorio de bacterias uropatógenas. En las cerdas suele darse la situación inversa, donde el TU puede ser la fuente de bacterias productoras de metritis (Fangman y Carlson Shannon, 2007). La microbiota vaginal es dinámica y situaciones que resultan en la pérdida de la población protectora de *Lactobacillus* spp. pueden favorecer la aparición de infecciones en el TUG (Stapleton, 2016). Asimismo condiciones que promueven la disbiosis pueden ser la deficiencia de estrógenos, la terapia antimicrobiana, el uso de anticonceptivos, el tipo de vida sexual y el estrés (Stapleton, 2016; Matsumoto y col., 2018; Amabebe y Anumba, 2018a). La exposición persistente al estrés y la estimulación de los ejes hipotálamo-hipófisis-suprarrenal y simpático-suprarrenal-medular, con un aumento correspondiente en los niveles de cortisol y norepinefrina, se asocian con disbiosis y una mayor susceptibilidad a infecciones, incluidas las infecciones del TUG (Amabebe y Anumba, 2018a).

## VII. Alteraciones en la salud reproductiva de la cerda y performance de la camada: rol de *Escherichia coli*

*Escherichia coli* se encuentra ampliamente distribuida en el medio ambiente y forma parte de la microbiota comensal de mucosas de muchos mamíferos, incluidos humanos y animales de granja como los cerdos. Este microorganismo coloniza las mucosas de los animales desde el nacimiento, al ser adquirida de la madre y del medio ambiente. La mayoría de las cepas no son patógenas para el hospedador y solo un pequeño grupo es capaz de producir enfermedades (Kaper y col., 2004; Gyles y Fairbrother, 2010).

*Escherichia coli* patógena causa numerosas enfermedades en los animales de granja (Gyles y Fairbrother, 2010; Dubreuil y col., 2016). En porcicultura las infecciones por *E. coli* afectan de lleno la productividad de los establecimientos porcicultores ya que tienen como blanco principal a las cerdas y sus camadas de lechones, tanto en países desarrollados como subdesarrollados (Fairbrother y Gyles, 2012). Es uno de los patógenos aislados con mayor frecuencia de cerdas con mastitis, SDPP e ITU (Gerjets y Kemper, 2009; Fairbrother y Gyles, 2012; Piassa y col., 2015; Moreno y col., 2017), afecciones pueden llevar al descarte no programado de cerdas.

En los lechones provoca diarrea neonatal, diarrea postdestete y enfermedad de los edemas (ED). Todas estas patologías afectan la performance de las camadas, ocasionando importantes pérdidas económicas debido a la morbilidad, la mortalidad, la disminución en el aumento de peso, así como el costo del tratamiento, las vacunas y los complementos alimentarios (Fairbrother y Gyles, 2012; Dubreuil y col., 2016).

### VII. 1 Características de *Escherichia coli* patogénicas

Las cepas patogénicas de *E. coli* pueden dividirse en dos grandes grupos: *E. coli* patógena intestinal y *E. coli* patógena extraintestinal (ECPEX) (Kaper y col., 2004). Los patotipos intestinales que afectan al ganado porcino son *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* productora de toxina Shiga (ECTS) y *E. coli* enterotoxigénica (ECET) siendo responsables de patologías que afectan a los lechones como ser diarrea neonatal, diarrea postdestete y ED (Fairbrother y Gyles, 2012). Estos patotipos poseen determinantes de patogenicidad o **factores de virulencia** (FV) que los caracterizan. Las cepas ECEP poseen en su membrana externa una proteína denominada intimina, que junto con proteínas efectoras inyectadas por la bacteria en los enterocitos del hospedador, producen la adhesión íntima de ECEP al enterocito, provocando una lesión característica del epitelio que consiste en la desaparición o “borrado” de las microvellosidades. Estas *E. coli* poseen una isla de patogenicidad cromosómica (PAI por “pathogenicity island”) donde se encuentra el gen *eae* que codifica para intimina (Kaper y col., 2004; Fairbrother y Gyles, 2012). ECET es el patotipo más implicado en diarreas en los animales de granja (Nagy y Fekete, 2005; Dubreuil y col., 2016) y es el más importante en cerdos (Fairbrother y Gyles, 2012). Los FV

característicos de este patotipo son enterotoxinas entre las que existen dos clases principales: las termoestables (ST) y las termolábiles (LT). Las cepas de ECET pueden expresar una o ambas toxinas. Las enterotoxinas ST pueden ser de dos tipos: STa y STb, las cuales tienen una estructura molecular y mecanismos de acción diferentes (Kaper y col., 2004; Dubreuil y col., 2016). Asimismo, se ha descrito que las adhesinas fimbriales que generalmente están presentes en las cepas que producen enfermedades en cerdos y terneros son K99 (F5) y F41 (Gyles y Fairbrother, 2010). La diarrea neonatal y la diarrea postdestete de los lechones son provocadas principalmente por este patotipo. En la diarrea neonatal suelen estar implicadas cepas que solo poseen la enterotoxina STa y un tipo o más de las adhesinas fimbriales F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P) y F41. En la diarrea postdestete están implicadas cepas que poseen uno o varios tipos de enterotoxinas (STa, STb, LT) y generalmente tienen la fimbria F4 (K88) o la fimbria F18 (Fairbrother y Gyles, 2012; Luppi y col., 2016).

En la enfermedad de los edemas (ED), que tiene efectos devastadores en las camadas, está implicada *E. coli* productora de toxina shiga (STEC). Las STEC constituyen un grupo que se caracteriza por producir una o más citotoxinas conocidas colectivamente como toxinas Shiga (Stx por sus siglas en inglés), nombradas de esta forma debido a la similitud estructural que poseen con la Stx de *Shigella dysenteriae* (Mainil, 1999). Las cepas implicadas en la ED se caracterizan por tener una variante de la toxina shiga llamada Stx2e y las adhesinas fimbriales F18ab o F18ac (DebRoy y col., 2009).

El ganado porcino también sufre infecciones por ECPEx, las que constituyen un grupo heterogéneo de *E. coli* cuyos miembros están implicados en una amplia gama de infecciones, como septicemia, ITU, infecciones del tracto genital y de las glándulas mamarias (Gyles y Fairbrother, 2010).

Normalmente se encuentran como comensales en la microbiota intestinal de individuos sanos (Köhler y Dobrindt, 2011). ECPEx aisladas de infecciones en humanos pueden compartir FV con las aisladas de infecciones en animales, pudiendo estos últimos actuar como reservorios (Singer, 2015); de hecho cepas patógenas de humanos y animales no difieren mucho en su genética (Johnson y col., 2008; Clermont y col., 2011). A diferencia de ECET, ECEP y ECST, no se caracterizan por la presencia de un FV o grupo de factores en particular, sino que generalmente poseen una gran cantidad de FV que pueden variar mucho entre las cepas. Estos incluyen FV que contribuyen a la colonización bacteriana, la invasión, la captación de hierro, la resistencia a los efectos bactericidas del complemento y a la fagocitosis (Gyles y Fairbrother, 2010). Sin embargo se describieron diversos sub-patotipos en base al sitio donde producen la infección y a que comparten todos o algunos FV (Vila y col., 2016). Algunos de estos sub-patotipos son: *E. coli* uropatogénico (ECUP) responsable de infecciones urinarias en humanos y animales (Thompson y col., 2011; Singer, 2015; Terlizzi y col., 2017; Spindola y col., 2018), *E. coli* asociada a Infecciones

Sistémicas En Aves (APEC) responsable de infecciones sistémicas en pollos (Moulin-Schouleur y col., 2007), *E. coli* patógena mamaria (MPEC) responsable de mastitis en vacas (Shpigel y col., 2008), *E. coli* endometriopatogénico (EnPEC) responsable de endometritis en vacas (Sheldon y col., 2010), *E. coli* asociado a meningitis neonatal (NMEC) en humanos (Bonacorsi y Bingen, 2005 ) y *E. coli* septicémico (ECSEP) asociado a septicemias en animales de granja (Gyles y Fairbrother, 2010). Los FV asociados a ECUP que afecta a humanos están bien descritos y estudiados (Subashchandrabose y Mobley, 2015; Terlizzi y col., 2017) y si bien están informados aquellos encontrados en ECUP de cerdas con pielonefritis, aún no se definieron perfiles de virulencia que afectan específicamente el TUG de las mismas, así como tampoco se han descrito las características genéticas de las *E. coli* comensales de este tracto. La endometritis posparto en vacas producida por *E. coli* se asocia a la prolongación de la fase luteal, ya que el LPS interfiere en el cambio de prostaglandina E2 por prostaglandina F2 $\alpha$  necesaria para la luteólisis (Herath y col., 2009). Asimismo infusiones intrauterinas de *E. coli* en cachorras (cerdas maduras sexualmente) durante la fase lutea temprana, produjeron endometritis con descarga vaginal y alteraciones en la producción de prostaglandinas (E2 y F2 $\alpha$ ) que afectaron la función ovárica (Jana y col., 2007).

Se conoce que la mayoría de las cepas de ECPE<sub>x</sub> pertenecen a los grupos filogenéticos B2 y D, y han adquirido varios genes de virulencia que les permiten inducir infecciones extraintestinales en hospedadores inmunocompetentes y comprometidos (Smith y col., 2007). Las *E. coli* extraintestinales comensales usualmente pertenecen a los grupos filogenéticos A y B1 (Köhler y Dobrindt, 2011).

La persistencia de *E. coli* en el ambiente se debe en gran parte a su capacidad de formar biofilm o biopelículas, que constituye un estilo de vida alternativo para los microorganismos, en el que adoptan un comportamiento multicelular que facilita y/o prolonga su supervivencia en diversos nichos. Los biofilms se forman en superficies bióticas y abióticas, tanto en el medio ambiente como en el entorno sanitario, actuando como reservorios para patógenos a partir de los cuales pueden propagarse fácilmente y colonizar nuevos nichos. Dentro del hospedador, los biofilms permiten que los patógenos sorteen las defensas inmunes innatas asociándose de esta forma a la persistencia a largo plazo (Kostakioti y col., 2013). *E. coli* puede formar biopelículas prácticamente en todas partes, por ejemplo en la vejiga durante una infección del TU, en dispositivos médicos como catéteres, y en el medioambiente (plantas y suelos). La matriz extracelular de *E. coli* está compuesta principalmente por la polimerización de la fimbria curli y el polisacárido celulosa, y suele incluir también la participación del pili tipo 1, flagelos, el antígeno 43 (ag43), ADN,  $\beta$ -1,6-N-acetilglucosamina ( $\beta$ -1,6-GlcNAc), azúcares capsulares y ácido colónico. La matriz promueve la adherencia a las superficies orgánicas e inorgánicas, y otorga resistencia a la

desecación, al sistema inmune del hospedador y a los agentes antimicrobianos (Beloin y col., 2008; Hufnagel y col., 2015).

## **VII.2 Uso de antibióticos en porcicultura. Resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* en sistemas porcinos**

Tradicionalmente los antibióticos se utilizan en porcicultura con tres finalidades: como promotores del crecimiento, como tratamiento profiláctico o metafiláctico para prevenir enfermedades y como terapéutico (Barton, 2014; Ben Lagha y col., 2017). Además, los diluyentes utilizados para el fraccionamiento y conservación del semen destinado a inseminación artificial están adicionados con antibióticos como estreptomicina, penicilina y lincomicina para prevenir la presencia de leptospirosis y micoplasmas (Johnson y col., 2000; Directiva del Consejo Europeo 90/429/CEE). El uso como promotores de crecimiento es el más controversial porque involucra la adición en el alimento de antibióticos de la misma familia química que aquellos que resultan valiosos o críticos en el tratamiento de infecciones humanas (Barton, 2014; Van Boeckel y col., 2015). Se ha informado que la frecuencia de bacterias portadoras de genes de resistencia a los antimicrobianos es más alta en el estiércol de cerdo que en el de otros animales de granja (Heuer y col., 2011).

Aunque la administración de antibióticos esté dirigida a controlar bacterias patógenas, las bacterias comensales también se ven afectadas. Por lo tanto, la microbiota intestinal refleja la historia de uso de antibióticos y constituye un reservorio específico de cepas resistentes (Mazurek y col., 2018). Tanto *E. coli* comensales como patógenas porcinos pueden adquirir resistencia a los antibióticos debido a la administración de antimicrobianos como promotores del crecimiento y como tratamiento y/o prevención (profilaxis) de enfermedades bacterianas (Fairbrother y Gyles, 2012; Barton, 2014; Aarestrup, 2015). *E. coli* es utilizada como microorganismo indicador en los estudios de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos en animales, debido a que la adquiere fácilmente y a que es un integrante común de la microbiota intestinal de los mismos (EFSA, 2008). Cuando cepas de *E. coli* son resistentes a los antimicrobianos de elección en tratamientos de infecciones graves y para las cuales existen alternativas limitadas en la medicina humana (como las cefalosporinas de tercera generación y las fluoroquinolonas), constituyen una amenaza para la salud pública (Fairbrother y Gyles, 2012) particularmente cuando ingresan en la cadena alimentaria (Kaesbohrer y col., 2012) o al reservorio hospitalario a través de los operarios de los establecimientos pecuarios y de su entorno familiar íntimo (Aarestrup, 2015).

Se estima que alrededor del 75% de los antibióticos administrados a animales se excretan sin modificaciones a través de las heces o la orina (Chee-Sanford y col., 2009). Este porcentaje suele ser mayor en el caso del tratamiento oral con colistina, ya que se absorbe muy poco en el tracto gastrointestinal de los cerdos (Rhouma y col., 2016a). La colistina es un antibiótico ampliamente utilizado en medicina veterinaria, particularmente en

cerdos, para el tratamiento oral de infecciones intestinales causadas por enterobacterias, principalmente *E. coli*, pero también como promotor de crecimiento (Rhouma y col., 2016a). En humanos este antibiótico es la última opción de tratamiento frente a enterobacterias resistentes a carbapenemes (Gurjar, 2015). A finales del año 2015, se identificó el gen plasmídico *mcr-1* que codifica para una fosfoetanolamina transferasa que confiere resistencia a la colistina en algunos bacilos Gram negativos aislados de animales de granja, carne cruda y humanos en varios países (Liu y col., 2016; Rhouma y col., 2016a). La rápida transferencia horizontal de este plásmido provocó la alarma mundial respecto al uso de este antibiótico en producción porcina (Rhouma y col., 2016b). En consecuencia, expertos, científicos y agencias gubernamentales han pedido la reducción del uso de colistina en cerdos y han enfatizado que este antibiótico se debe usar solo para el tratamiento de animales enfermos como último recurso terapéutico en circunstancias estrictas (Rhouma y col., 2016b).

## VIII. Estrategias alternativas para controlar las infecciones del tracto urogenital (TUG) porcino: probióticos

En la actualidad se comercializan varios aditivos para piensos para ayudar a reforzar el sistema inmunológico de los cerdos, regular la microbiota intestinal y reducir el impacto negativo del destete. Los aditivos para piensos más comúnmente usados incluyen acidificantes, sales de zinc (Zn) y cobre (Cu), prebióticos, levaduras y productos derivados de ellas, nucleótidos, extractos de plantas y probióticos (Liu y col., 2018).

Los acidificantes a menudo se usan como alternativas a los antibióticos promotores de crecimiento debido a su capacidad para crear un ambiente intestinal favorable para los microorganismos benéficos, lo que puede resultar en una mayor digestibilidad de los nutrientes, un mayor rendimiento del crecimiento y una reducción de los casos de diarrea (Liu y col., 2018). Los acidificantes pueden ser ácidos orgánicos, inorgánicos o sales de ácidos (Papatsiros y Billinis, 2012).

Cobre y Zinc son minerales necesarios para el funcionamiento normal de diversas enzimas de los cerdos, las que utilizan sus iones como cofactores, además tienen propiedades antimicrobianas por lo que a menudo se agregan a las dietas en cantidades superiores a las necesarias para cumplir con los requisitos nutricionales (Liu y col., 2018). El uso de ZnO y Cu<sup>2+</sup> en niveles farmacológicos se utiliza comúnmente para reducir la diarrea post-destete y mejorar la ganancia de peso en los lechones (Hu y col., 2012; Ma y col., 2015). En la Unión Europea se interrumpirá la inclusión de niveles farmacológicos de ZnO a partir de 2022 debido a las preocupaciones sobre la acumulación de Zn en el suelo fertilizado con estiércol de cerdo (Liu y col., 2018).

Los prebióticos son principalmente oligosacáridos no digeribles y recientemente se han redefinido como "un sustrato que es utilizado selectivamente por los microorganismos del hospedador confiriendo un beneficio para la salud" (Gibson y col., 2017). Así se demostró que resultan eficientes contra el establecimiento de patógenos entéricos (*E. coli* y *Salmonella*) en lechones (Tran y col., 2018). La suplementación de los piensos con levaduras o producto a base de levadura puede aumentar el rendimiento el crecimiento de los cerdos, estimular la inmunidad de la mucosa, promover el desarrollo intestinal, adsorber micotoxinas, reducir la diarrea postdestete y modular la microbiota intestinal (Kogan y Kocher, 2007; Shen y col., 2009; Jiang y col., 2015). La administración de extractos de la pared de levaduras demostró ser eficiente en el tratamiento de IU en el posparto (Lazarevic y col., 2012). Diferentes extractos de plantas demostraron ser buenos candidatos para reemplazar a los antibióticos en los alimentos, mejorando el crecimiento y la salud de los cerdos en diferentes etapas (Liu y col., 2018). Así, extractos de capsicum, cúrcuma o ajo redujeron la frecuencia de diarrea por *E. coli* y mejoraron la salud intestinal de lechones



destetados (Liu y col., 2013a), y resultaron efectivos para disminuir la carga viral en lechones destetados infectados con PRRSV (Liu y col., 2013b).

Una amplia gama de microorganismos han sido estudiados como probióticos, llegando a formar parte de numerosos productos comerciales que se promocionan y comercializan como complementos alimenticios para humanos o aditivos para piensos de animales de granja como el ganado porcino (Ahasan y col., 2015; Liao y Nyachoti, 2017). Los **probióticos** se definen como “microorganismos viables que se administran al hospedador en cantidades adecuadas para producir un efecto fisiológico benéfico” (FAO/WHO, 2001; Sanders, 2008). La mayoría de estos microorganismos pertenecen al grupo de las denominadas bacterias lácticas (BL), que comprenden varios géneros: *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Lactobacillus* (bacilos); *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* (cocos), y *Weissella* (morfología de cocoide o bacilar) (Ahmed, 2003; Walter y col., 2008; Ventura y col., 2009; Fusco y col., 2015).

En porcicultura particularmente se han utilizado: BL, especies de *Bacillus*, *Bifidobacterium* y *Saccharomyces cerevisiae* (Konstantinov y col., 2008; Kenny y col., 2011); algunos probióticos se utilizan en los piensos para fijar las micotoxinas y evitar su efecto indeseable en la performance de las camadas (Dänicke y Döll, 2010). El mayor interés en los probióticos se debe esencialmente al problema de la resistencia microbiana a los antibióticos y a la prohibición en la Unión Europea del uso de antibióticos en producción animal. Frente a esta problemática se ha propuesto que es posible mantener el equilibrio las microbiotas autóctonas mediante la administración de probióticos y, así, prevenir el desarrollo de infecciones mejorando la salud animal. Asimismo, se utilizan para mejorar parámetros de producción, que generalmente están asociados a incrementar la conversión del alimento y la ganancia en peso y a la prevención de infecciones causantes de morbimortalidad en porcicultura (Ross y col., 2010).

En el ganado porcino el período los días previos y posteriores al parto, las primeras semanas de vida y los días posteriores al destete representan momentos críticos en los que el suministro de probióticos es necesario para establecer una microbiota beneficiosa capaz de resistir a cambios ecológicos adversos como el que ocurre en el momento del destete (Kenny y col., 2011). El suministro de probióticos a las cerdas antes y después del parto permite saturar el ambiente de los lechones recién nacidos con microorganismos benéficos, facilitando la incorporación de los mismos a sus microbiotas (Buddington y col., 2010; Hayakawa y col., 2016; Shokryazdan y col., 2017).

Los beneficios de la administración de probióticos en el ganado porcino incluyen la mejora del estado sanitario y de los parámetros de crecimiento, lo que en última instancia aumenta la productividad del establecimiento porcicultor (Kenny y col. 2011; Yang y col. 2015). Hayakawa y col. (2016) informaron que la administración de un probiótico comercial

(*Bacillus mesentericus*, *Clostridium butyricum* y *Enterococcus faecalis*) a cerdas, mejoró significativamente el retorno al estro, el peso de sus camadas en el nacimiento y el rendimiento de estas en el destete. En el ganado porcino está reportado que especies del género *Lactobacillus* y algunas combinaciones con *Bifidobacterium* reducen la colonización y la infección por *E. coli* en lechones, como así también mejoran la ganancia en peso diario (Konstantinov y col., 2008), modulan la respuesta inmune (Walsh y col., 2008; Martín y col., 2009; Wang y col., 2009; Ross y col., 2010; Zhang y col., 2011) y actúan como promotores del crecimiento de las vellosidades intestinales (Suo y col., 2012).

Ahasan y col. (2015) demostraron que algunas especies probióticas pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Lactobacillus* y *Streptococcus*, mejoraron la calidad del calostro, la calidad y cantidad de leche, el tamaño y la vitalidad de la camada y el peso corporal de los lechones. Kritas y col. (2015) describieron que el suministro de esporas viables de una cepa de *Bacillus subtilis* a cerdas y sus camadas de lechones durante dos ciclos reproductivos completos logró, mejorar la condición corporal de las cerdas, disminuir la pérdida de peso de las mismas durante la lactancia y aumentar el peso de los lechones al momento del destete en los 2 ciclos estudiados. Asimismo el tratamiento logró disminuir la presencia de *E. coli* y *Clostridium* spp. en heces de los lechones del segundo ciclo.

El rol protector de las BL frente a infecciones vaginales ha sido descrito en humanos (Reid, 2017; Amabebe y Anumba, 2018b) y bovinos (Otero y col., 2006; Genís y col., 2018), por lo que el mantenimiento de una microbiota beneficiosa en el TUG de las cerdas podría prevenir la ocurrencia de infecciones que son devastadoras para la productividad de los sistemas porcinos.

El conocimiento de la microbiota de las mucosas vulnerables de las hembras en los sistemas de cría ayuda a la comprensión de los cambios que ocurren en las diferentes etapas del sistema productivo y, por lo tanto, al entendimiento de la susceptibilidad frente a infecciones por agentes bacterianos como *E. coli*.



## OBJETIVOS

### **Objetivo general**

Evaluar y caracterizar la microbiota autóctona del tracto urogenital (TUG) de cerdas en diferentes condiciones reproductivas, y seleccionar microorganismos benéficos (MB) que puedan incluirse en suplementos veterinarios, con función de reconstituyentes microbianos para la prevención de infecciones posparto.

### **Objetivos específicos**

1. Evaluar la microbiota autóctona del TUG porcino de hembras en diferentes situaciones del manejo reproductivo en un sistema de producción mixto.
2. Caracterizar *E. coli* nativas del TUG porcino con potencial patogénico.
3. Aislar y seleccionar bacterias lácticas (BL) indígenas potencialmente benéficas del TUG porcino.



## MATERIALES Y MÉTODOS

## I. ANIMALES Y TOMA DE MUESTRAS

### I.1 Animales: categorías

Las muestras utilizadas en el presente trabajo se obtuvieron de animales pertenecientes a establecimientos porcicultores de la provincia de Tucumán. Un total de 47 cerdas fueron seleccionadas en base a su estado sanitario y aptitud reproductiva:

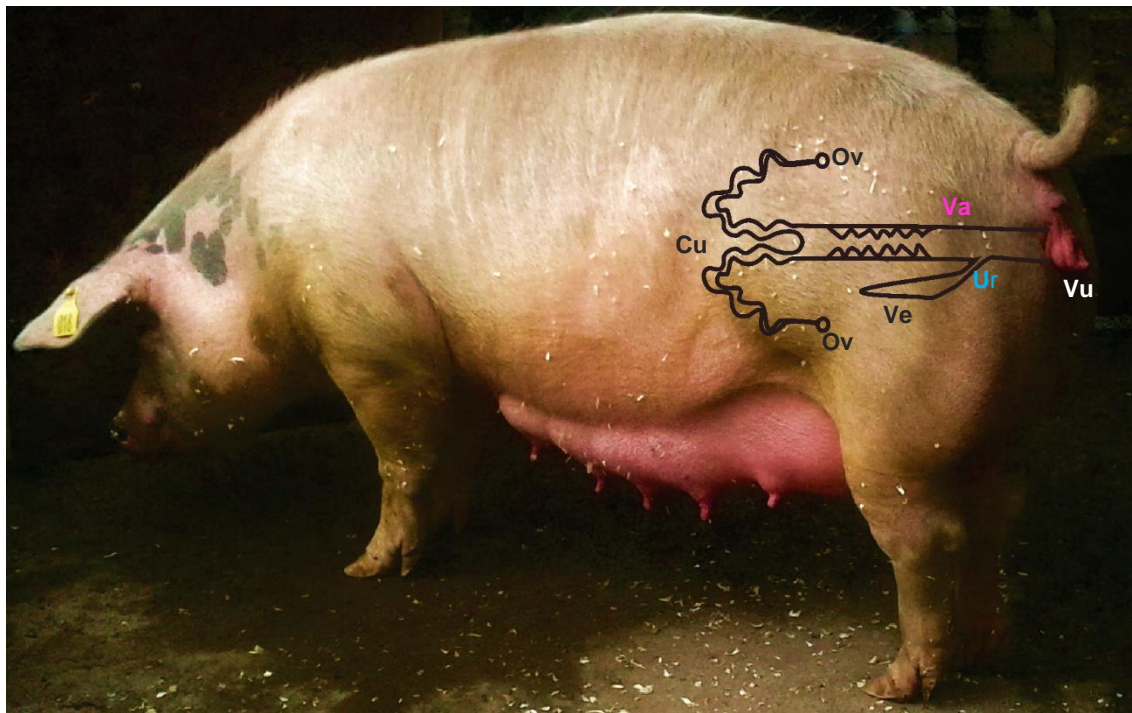
- a) 10 cerdas preñadas por monta o servicio natural (SN) ( $60 \pm 10$  días).
- b) 10 cerdas preñadas por inseminación artificial (IA) ( $60 \pm 10$  días).
- c) 10 cachorras o cerdas de reposición (hembras vírgenes, sexualmente maduras de aproximadamente 8 meses de edad) (CV).
- d) 17 cerdas enfermas (E) (dentro de este grupo se incluyeron cerdas con trastornos reproductivos como ser descarga vulvar, repeticiones de celo y mastitis).

### I.2 Preparación de los animales: obtención de las muestras

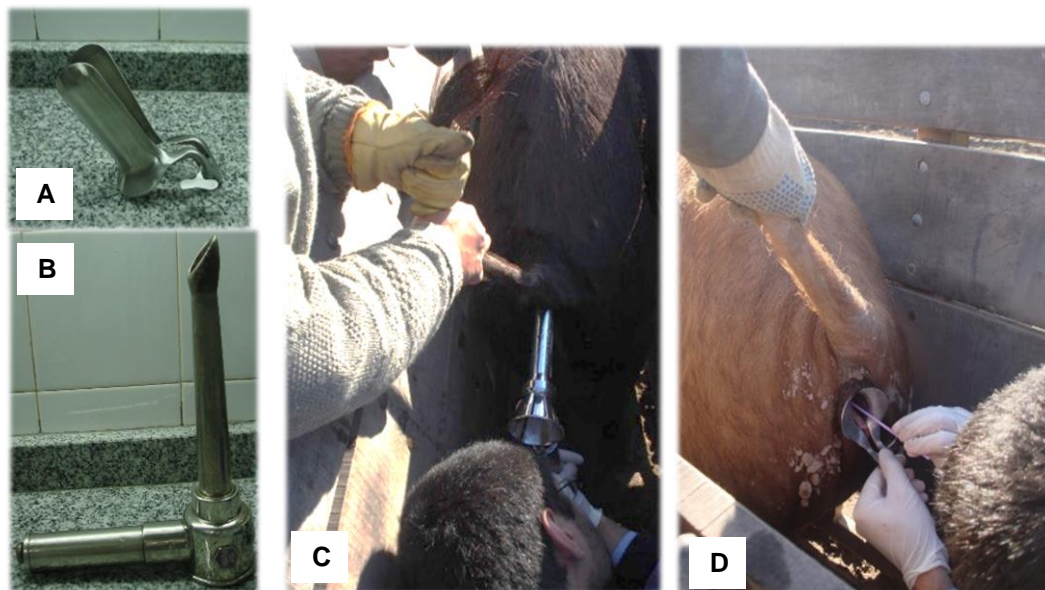
Previo al muestreo, los animales fueron ubicados individualmente en la cabina de trabajo de la manga donde fueron correctamente sujetos. Antes de proceder a la toma de muestra, se realizó la limpieza de la zona perineal y vulvar de cada animal con agua y jabón secando posteriormente con toallas de papel. La evaluación del perfil clínico de las hembras y la toma de muestras se realizaron bajo la supervisión de los médicos veterinarios Alfredo Martín (INTA-Leales) y Ramiro Rosa (FAZ-UNT). La disposición de los órganos del tracto urogenital (TUG) pueden observarse en la **Fig.6**.

**Obtención de muestras de mucosa vaginal:** a continuación se introdujo en la vagina un vaginoscopio estéril de acero inoxidable (**Fig. 7B**), previa humectación con una pequeña cantidad de gel lubricante estéril libre de antisépticos (0,8% v/v carbopol, 1% v/v trietanolamina, 10% v/v glicerina, Sigma-Aldrich) y se observó el estado de la mucosa vaginal (**Fig. 7C**).

**Obtención de muestras de mucosa uretral:** se utilizó un espéculo de acero inoxidable estéril (**Fig. 7A**), con una pequeña cantidad de gel lubricante estéril libre de antisépticos para acceder a la uretra a través del meato urinario (**Fig. 7D**).



**Figura 6. TUG de cerdas y ubicación anatómica de los nichos muestreados. Va** fondo de vagina, **Ur** uretra; **CU** cuernos uterinos; **Ov**: ovarios; **Ve** vejiga, **Vu** vulva.



**Figura 7. Instrumentos usados para la toma de muestra A) Espéculo, B) Vaginoscopio; Toma de muestras: C) de vagina, D) de uretra.**

**Recolección del material:** por cada animal se recolectaron muestras con un *citobrush* y un hisopo estéril para la muestra vaginal (ambos instrumentos fueron adosados a un mango especial) raspando suavemente la pared de la región craneal de vagina para estudios bacteriológicos y citológicos, respectivamente (Kasimanickam y col., 2005). Para la mucosa uretral, la toma de muestra se realizó solo con un *citobrush*. Cada *citobrush* cargado con material de raspado se colocó en un tubo Falcon conteniendo 1 mL de solución salina bufferada con fosfato (PBS), pH 7,0, y se mantuvo refrigerado (8°C) hasta su procesamiento en el laboratorio. Con cada hisopo se realizó un extendido sobre portaobjetos para estudios citológicos (ver apartado siguiente). Asimismo, se determinó el pH vaginal con el empleo de tiras reactivas. El tiempo transcurrido entre la toma de muestras y su procesamiento fue menor a 4 h.

Para favorecer el desprendimiento de los microorganismos retenidos en el *citobrush*, los tubos Falcon se agitaron en vórtex durante 2 min. Los cepillos se retiraron y se colocaron en tubos con caldo MRS (ver apartado IV.1.1). Del contenido de cada tubo Falcon se tomaron alícuotas (200 µL) destinadas al estudio y cuantificación de las poblaciones microbianas cultivables (UFC/mL) (ver apartado II.3). Finalmente se conservaron los 800 µL restantes de las muestras a -80°C para los estudios microbiológicos independientes de cultivo.

### **I.3 Evaluación citológica de la mucosa vaginal del tracto urogenital (TUG)**

Los portaobjetos con los extendidos vaginales (apartado I.2) se dejaron secar, se fijaron en el laboratorio con metanol (2 min) y luego se tiñeron con Giemsa (15 min) (McDougall y col., 2011). Los mismos se analizaron por microscopía óptica según lo propuesto por Oravainen y col. (2008) para lo cual se observaron (con objetivo de inmersión 100x) los preparados citológicos y se realizó el recuento de leucocitos en 10 campos. Las muestras se dividieron en cuatro grupos: sin leucocitos (0), 1-10 leucocitos (+), >10 leucocitos individuales (++) y leucocitos agrupados en “nidos” (+++). La inflamación se consideró negativa para los resultados 0 y +, y positiva para ++ y +++.



## II. ESTUDIO DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS NATIVAS DE URETRA Y VAGINA PORCINA

### II.1 Análisis microbiológicos dependientes de cultivo

De las muestras procesadas como se indicó anteriormente (apartado I.2.) se tomaron alícuotas, a partir de las cuales se realizaron diluciones sucesivas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ) en solución fisiológica (SF) estéril. Las mismas se sembraron (50  $\mu$ L) por agotamiento en la superficie de placas con medios agarizados utilizando una espátula de Drigalsky. Todas las placas se incubaron durante 24-72 h a 37°C, asimismo las placas de Agar Sangre (A.S) se incubaron en condiciones de microaerofilia (5% CO<sub>2</sub>). Una vez concluido el período de incubación, se determinó el número de microorganismos viables, expresados como Unidades Formadoras de Colonias por mL (UFC/mL) para realizar la cuantificación de las poblaciones microbianas cultivables (**Fig.8**).

#### 1.1 Medios para el aislamiento y cuantificación de microorganismos

Los medios de cultivo empleados en este trabajo y su composición son los siguientes:

- **LAPTg agar** en g/L: peptona, 15; triptona, 10; extracto de levadura, 10; D-glucosa, 10; agar, 15; pH: 6,8.

- **Agar Sangre (A.S)** en g/L: pluriptona, 5; extracto de carne, 3; sangre entera anticoagulada 5%; agar, 15.

- **Mac Conkey (MC)**: en g/L: peptona de caseína, 20; lactosa, 10; bilis de buey desecada, 5; púrpura de bromocresol, 0,01. pH: 7,1. Medio selectivo para el aislamiento de enterobacterias.

- **Manitol Salt Phenol-Red Agar (MSA)**: en g/L: peptona de carne, 10; extracto de carne, 1; NaCl, 75; D (-) manitol, 10; rojo fenol, 0,025; agar, 12. pH: 7,4. Medio selectivo para el aislamiento de estafilococos.

- **Bilis Esculina Agar con azida (BEA)**: en g/L: azida sódica, 0,15; bilis de buey, 10; citrato de hierro y amonio, 0,5; NaCl, 5; esculina, 1; extracto de carne, 5; proteasa peptona, 3; triptona, 17; agar, 15. pH: 6,6. Medio selectivo para el aislamiento de *Enterococcus*/*Streptococcus* Grupo D.

- **Esporulados**: LAPTg en g/L: Se tomaron 100  $\mu$ L de las muestras de vagina se incubaron durante 15 min a 80°C y luego se realizaron las diluciones y la siembra en LAPTg agar. Este tratamiento permite seleccionar los esporulados (Leuschner y col., 2003).

- **de Man Rogosa & Sharpe (MRS)**: en g/L: peptona de carne, 10; extracto de carne, 10; extracto de levadura, 5; glucosa, 20; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2; MgSO<sub>4</sub>, 2; MnSO<sub>4</sub>.4 H<sub>2</sub>O, 0,05; acetato de sodio, 5; citrato triamónico, 2; tween 80, 1 mL; agar, 15. pH: 5,5. Medio selectivo para el aislamiento de bacterias lácticas (BL) (de Man y col., 1960).

## 1.2 Medios para subcultivo y crecimiento

Los medios líquidos utilizados para subcultivar los microorganismos para el aislamiento y caracterización son:

-**LAPTg**: en g/L: peptona, 15; triptona, 10; extracto de levadura, 10; D-glucosa, 10; tween 80, 1 mL. pH: 6,8 (para los microorganismos crecidos en BEA y MSA).

-**Caldo nutritivo** en g/L: pluripectona (peptona de carne + caseína), 5; extracto de carne, 3. pH: 6,9 (para enterobacterias).

-**MRS**: pH: 5,8. Los microorganismos que crecieron en MRS agar pH 5,5 se subcultivaron en este medio (para BL).

- **Luria Bertani (LB)**: en g/L: triptona, 10; NaCl, 5; extracto de levadura, 5. pH: 7 (Bertani 1951), (para *E. coli*).

## 3.3 Conservación de los microorganismos

Cultivos activos de los microorganismos aislados se transfirieron a viales estériles conteniendo MRS o caldo nutritivo (según el medio original de aislamiento) adicionados con 20% de glicerol. Los mismos se conservaron a -20°C.

## II.2 Identificación fenotípica parcial de la microbiota cultivable de tracto urogenital (TUG) porcino

Para la selección de los aislados, se consideraron las características morfológicas de las colonias crecidas en los diferentes medios de cultivo selectivos así como los nichos y la categoría de cerda de la cual se tomaron las muestras.

### 2.1 Coloración de Gram-Nicolle

Se aplicó la técnica utilizada rutinariamente en el laboratorio: las células fijadas por calor se cubrieron con violeta de genciana durante 20 s, se lavaron con agua corriente y se adicionó lugol (mordiente). Luego de 30 s las células se lavaron y decoloraron con una mezcla de alcohol-acetona, se enjuagaron y posteriormente se colorearon con safranina (20 s). De esta manera las bacterias Gram (+) se tiñen de color azul-violeta y las Gram (-) de color rosa.

### 2.2 Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas que se realizaron, descritas en el Manual de Determinaciones Bacteriológicas de Bergey, se detallan a continuación, y en cada caso se especifican los componentes de los medios empleados:

-**Actividad catalasa** en portaobjeto se colocan 20 µL de cultivo activo con 20 µL de peróxido de hidrógeno 30 volúmenes.

- **Reducción de  $\text{KNO}_3$ :** en g/L: peptona de carne, 8,6; NaCl, 6,4;  $\text{KNO}_3$ , 1,5. pH: 7,2.

La presencia de nitritos se evidenció al adicionar gotas de una solución de  $\alpha$ -naftol ( $\alpha$ -naftol 1 g en 100 mL de etanol absoluto) y ácido sulfanílico (ácido sulfanílico 1 g en 100 mL de ácido acético 5 N). El nitrato residual se detectó mediante el agregado de polvo de Zn y la presencia de amonio con el reactivo de Nessler (KI, 7 g;  $\text{HgI}_2$ , 10 g; KOH, 10 g; agua destilada, 100 mL).

-**Producción de indol a partir de triptófano:** SIM medio en g/L: tripteína, 20; peptona, 6,1; sulfato de hierro y amonio, 0,2; tiosulfato de sodio, 0,2; agar, 3,5. pH:7,4. La producción de indol reveló con el reactivo de Ehrlich (solución alcohólica de *p*-dimetilamino benzaldehído).

-**Reacción de Voges-Prokauer:** en g/L: polipeptona, 7; glucosa, 5;  $\text{K}_2\text{PO}_4$ , 5; pH 6,9. La presencia de acetoína se reveló con una solución de  $\alpha$ -naftol (0,5 g de  $\alpha$ -naftol en 100 mL de etanol absoluto) y de KOH+creatina (KOH 40% en agua + 0,3 g de creatina).

-**Triple Sugar Iron (TSI):** en g/L: pluripeptona, 20; extracto de carne, 3; NaCl, 5; lactosa, 10; sacarosa, 10; D-glucosa, 1; citrato de amonio y hierro (III), 0,2; tiosulfato de sodio, 0,2; rojo fenol 0,025; agar, 13. pH: 7,4.

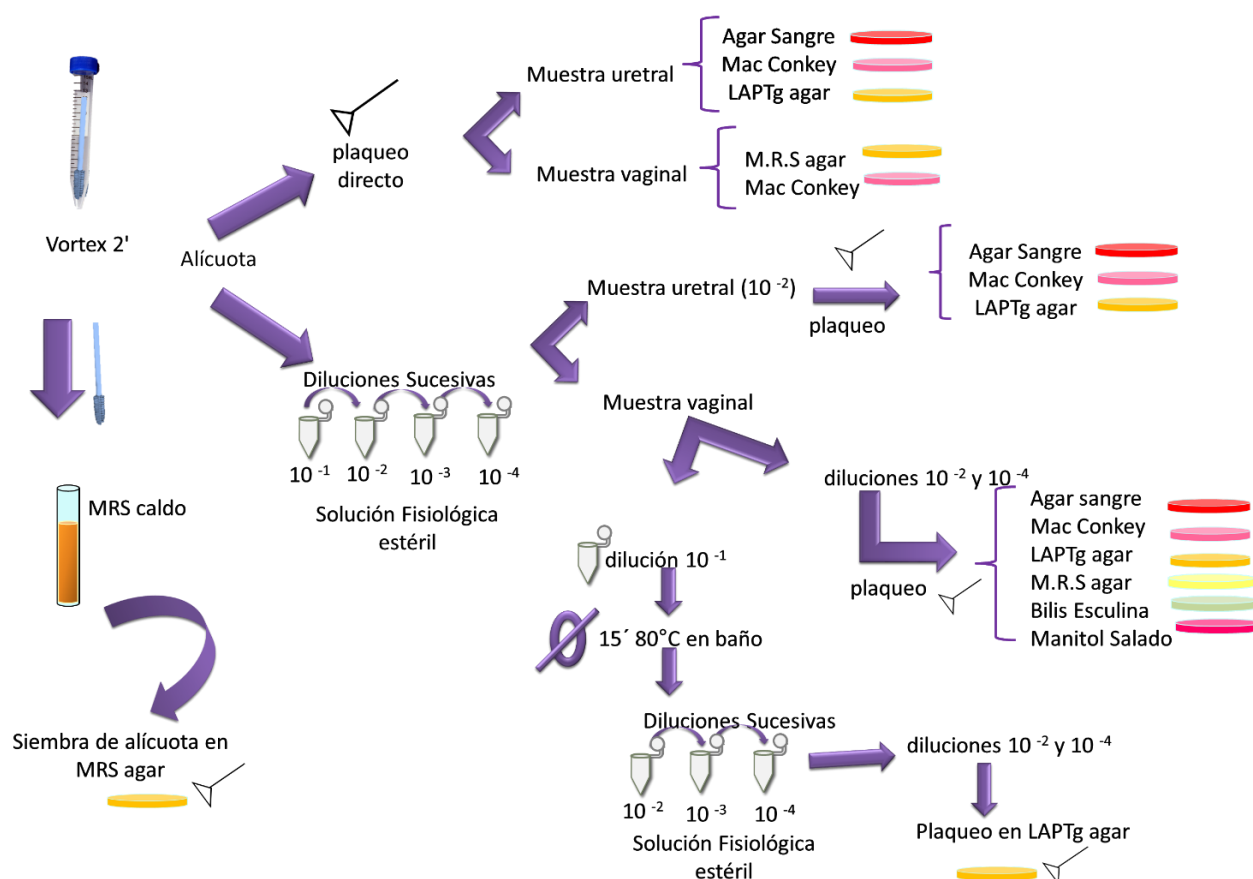
-**Utilización de citrato:** Agar Citrato de Simmons en g/L:  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , 1;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1; NaCl, 5; citrato de sodio, 2;  $\text{MgSO}_4$ , 0,2; azul de bromo timol, 0,08; agar, 12. pH: 6,6.

-**Utilización de urea:** en g/L: peptona de carne, 1; D-glucosa, 1; NaCl, 5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2; rojo fenol, 0,012; urea, 20; agar, 12. pH: 6,8.

-**Prueba de coagulasa:** se inoculan 50  $\mu\text{L}$  de un cultivo de 18 h del microorganismo a ensayar en 0,5 mL de plasma humano citratado. Se observa la formación o no de coágulo entre los 30 min y 4 h de incubación a 37°C.

- **Susceptibilidad a novobiocina:** los cultivos fueron crecidos en caldo Mueller Hinton (MH) durante 18 h a 37°C, y se ajustaron a valores de  $\text{D.O.}_{625 \text{ nm}} = 0,08-0,10$ , que corresponden a 0,5 de la escala de Mc Farland (0,5% de  $\text{BaCl}_2$ ). Las muestras se sembraron por hisopado en superficie en MH agar y se colocaron monodiscos conteniendo 0 5  $\mu\text{g}$  de novobiocina. Las placas se incubaron durante 24 h a 37°C. Se utilizaron tablas patrón para determinar sensibilidad o resistencia al antibiótico.

**Mueller Hinton Agar:** en g/L: infusión de carne, 300; peptona ácida de caseína, 17,5; almidón, 1,5; agar, 15. pH: 7,3.



**Figura 8:** Protocolo para el estudio de las comunidades bacterianas cultivables de vagina y uretra de cerdas

## II.3 Análisis microbológicos independientes de cultivo

### 3.1 Extracción del ADN total de material de raspado de las mucosas uretral y vaginal

A partir de las muestras conservadas a -80°C (apartado I.2) se realizó la extracción de ADN total de acuerdo al protocolo de purificación de ADN propuesto para muestras bucales (QIAamp DNA Mini Kit; Qiagen, Hilden, Alemania) con leves modificaciones como se detalla a continuación: a 200 µL de cada muestra de raspado uretral / vaginal se le adicionaron 20 µL de proteinasa K (600 mUA/mL Qiagen) y 200 µL de buffer de lisis y se incubaron a 56°C durante 1 h. Aquellas muestras con alto contenido en mucus fueron tratadas con 30 µL proteinasa K durante 2 h a 56°C. El ADN fue purificado y eluido de acuerdo a las instrucciones del fabricante, y conservado en buffer de elución a -20°C. La cuantificación e integridad del ADN se verificaron antes de realizar las reacciones de amplificación.

### 3.2 DGGE (Electroforesis en gel de poliacrilamida con gradiente desnaturizante)

Para identificar las poblaciones bacterianas presentes en el material del raspado uretral/vaginal mediante la técnica de DGGE, se amplificó la región V3 del gen 16S ARNr a partir del ADN total de cada muestra. Para ello, se utilizaron los siguientes cebadores, descritos por Fontana y col. (2005): V3f (GC) (5'-CC GGG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG A CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG) y Uni-0515r (5'-ATC GTA TTA CCG CGG CTG CTG CTG GCA-3'); las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 50 µL por reacción, con: 10 µL de buffer de reacción 5X (Promega- Bs As-Arg), 2,5 µL de cada cebador (10 µM), 2 µL de dNTP (5 mM), 5 µL de una solución de ADN (10 µg/mL) utilizada como templado, 0,3 µL de Taq polimerasa (5 U/µL GoTaq ADN Polimerasa- Promega- Bs As-Arg) y agua bidestilada filtrada esterilizada dos veces en c.s.p. 50 µL. Las condiciones de la reacción de PCR fueron las siguientes: 94°C por 5 min, 30 ciclos de 94°C por 30 s, 58°C por 1 min y 72°C por 1 min; y finalmente a 72°C por 7 min, seguido del enfriamiento de la reacción a 4°C. Controles de amplificación negativa fueron utilizados incluyendo ALN como templado. Los productos obtenidos fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 1.5% (p/v) y purificados con el Wizard SV Gel and PCR Clean- Up System (Promega) según indicaciones del fabricante, previo al análisis por DGGE.

La electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) se llevó a cabo en un sistema específico para DGGE, INGENY phorU-2 (Ingeny International BV, Goes, Holanda). Los productos purificados se resolvieron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% (p/v) con gradiente de urea-formamida; se ha determinado que un gradiente de 35-60% es suficiente para resolver las bandas de este tipo de muestras (Gonzalez Moreno y col., 2016). Las corridas electroforéticas se llevaron a cabo a 80 volts, 60°C por 18 h en buffer TAE 1X (0,04 M Tris - Acetato 0,001 M EDTA). Luego se realizó la tinción en una solución 1X SYBR Green I (Roche, Basel, Suiza) por 15 min. Las bandas se visualizaron en un sistema de fotodocumentación bajo iluminación UV. Los patrones de bandas obtenidos para las microbiotas uretral y vaginal de las hembras de diferentes categorías se normalizaron y analizaron mediante el software FINGERPRINTING II (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EE. UU.), utilizando el coeficiente de correlación de Pearson y el método de grupo de pares no ponderados usando la media aritmética (UPGMA) para la generación de dendogramas.

Posteriormente se escindieron las bandas distintivas del perfil electroforético resultante de cada muestra. Las mismas se eluyeron en 50 µL de ALN (4°C, 16 h). A partir de 5 µL del eluido se re-amplificó según el protocolo de ciclos descrito previamente, utilizando los mismos *primers*, en este caso V3f exento del "GC-clamp". Los amplicones resultantes se sometieron nuevamente a una corrida electroforética en gel con gradiente desnaturizante en las mismas condiciones, usando en cada caso como control al ADN amplificado de la

muestra de la cual proviene la banda. Esto se realizó para verificar la co-migración de la banda original y de la banda cortada y re-amplificada. Los productos de PCR que corrieron nuevamente como una sola banda fueron purificados usando Wizard SV Gel and PCR Clean- Up System (Promega) y enviados a secuenciar (BMR Genomics, Padoa, Italia). Las secuencias obtenidas se compararon con aquellas incluidas en las bases de datos (BLAST y/o Ribosomal Data base Project) mediante los algoritmos correspondientes para su identificación taxonómica.

### III. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE *Escherichia coli* NATIVAS DE URETRA Y VAGINA PORCINA

#### III.1 Aislamiento e identificación de *E. coli*

Las muestras de raspados vaginales y uretrales fueron sembradas en placas de agar Mac Conkey por agotamiento en superficie, e incubadas durante 48 h a 37°C. De cada placa se seleccionaron, como máximo, 4 colonias lactosa positiva que fueron identificadas por morfología (bacilos cortos Gram negativos), perfil bioquímico (TSI, producción de indol, utilización de citrato y reacción de Voges-Proskauer) y por la presencia del gen de la enzima  $\beta$ -D-glucuronidasa mediante reacción de PCR utilizando los cebadores indicados en la **tabla 3**. La reacción de PCR se realizó en un volumen total de 25  $\mu$ L. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C durante 90 s, y 30 ciclos con desnaturalización a 94°C durante 30 s, hibridación a 58°C durante 25 s y elongación a 72°C durante 30 s. (Horakova y col, 2008; Wang y col, 2013a). En todos los casos se obtuvo un producto del tamaño esperado (154 pb). Como templado se utilizó 2,5  $\mu$ L del lisado bacteriano que se obtuvo por calentamiento (90°C, 15 min) de una colonia (*overnight* en LB agar) suspendida en 50  $\mu$ L de ALN (Johnson y Stell, 2000; Clermont y col., 2013). Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (p/v) adicionado con GelRed (Biotium, USA.) y las bandas se visualizaron en un sistema de foto-documentación bajo iluminación UV.

### III. 2 Caracterización de las poblaciones de *Escherichia coli* nativas

#### 2.1 Evaluación clonal: rep-PCR

Con el objetivo de determinar la relación clonal existente entre los aislados de *E. coli*, se llevaron a cabo reacciones de rep-PCR. Con esta técnica se amplifican las regiones que separan las secuencias de ADN repetidas o repetitivas (secuencias rep) que se encuentran distribuidas en el cromosoma de muchas enterobacterias; obteniéndose productos de diferentes tamaños que se resuelven por electroforesis mostrando patrones de bandas característicos para cada clon bacteriano. Se utilizaron los *primers* ERIC2 (5' AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG 3') y BOX A1R (5' CTACGGCAAGGCGACGCTGACG 3') y se generó un *fingerprinting* genómico para cada uno según la técnica descrita por Versalovic y col. (1991). Las reacciones de amplificación por PCR se realizaron según el siguiente protocolo: volumen de reacción 25  $\mu$ L, molde 50 ng de ADN bacteriano (extraído como se indica en el párrafo siguiente), 10  $\mu$ M del *primer*, 2,5 mM de cada dNTP, 10 x buffer de PCR, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,5  $\mu$ L de CES 10x (13,4% de dimetilsulfóxido, 1,34 mM de DTT, 110  $\mu$ g/mL de albúmina sérica bovina) y 2,5 unidades de T-Free ADN polimerasa (Highway,

Argentina). Se incluyó un control negativo utilizando ALN en lugar del templado. El protocolo de amplificación consistió en: 1 min de desnaturalización inicial a 95°C, 35 ciclos de: desnaturalización a 94°C durante 1 min, 1 min de alineamiento (a 45°C para ERIC, a 50°C para BOX) y 8 min a 72°C, la reacción finalizó con una extensión a 72°C durante 10 min. Los productos fueron resueltos mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (p/v) adicionado con GelRed (Biotium, USA), a 70 volts durante 6 h y se utilizó el marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder GeneRuler (Thermo Fisher Scientific, USA). Las bandas se visualizaron en un sistema de foto-documentación bajo iluminación UV. Los *fingerprinting* de los ADN se analizaron utilizando la aplicación de Java denominada GelJ (Heras y col., 2015). El grado de similitud entre los *fingerprinting* se calculó con el Coeficiente de correlación de Pearson y el *clustering* se basó en el método del coeficiente no ponderado de grupo de pares utilizando promedios aritméticos (UPGMA).

La extracción y purificación del ADN bacteriano utilizado como molde en las reacciones de rep-PCR se realizó a partir de un cultivo *overnight* en caldo LB (37°C) de cada aislado, mediante la siguiente metodología: las células obtenidas por centrifugación se lavaron con 200 µL de buffer NaCl-Tris-EDTA (STE) (150 mM NaCl, 50 mM Tris, 50 mM Na<sub>2</sub>-EDTA). Seguidamente, se resuspendieron en 200 µL de PBS y se le adicionó 10 µL de proteinasa K (600 mUA/mL Qiagen) y buffer de lisis (Qiagen) y se incubaron en baño a 56°C (10 min). Luego, se adicionaron 140 µL de NaCl 5M y se extrajo el ADN utilizando fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y precipitándolo en isopropanol (Nadaroglu y col. 2015). Seguidamente se lavó con alcohol 70°, se lo centrifugó y dejó secar. Finalmente, se resuspendió en ALN y se conservó a – 20°C.

## 2.2 Conformación filogenética

Para clasificar los aislados de *E. coli* dentro de los cuatro principales filogrupos A, B1, B2 y D, se utilizaron los marcadores genéticos *chuA*, *yjaA* y TspE4.C2, según el criterio propuesto por Clermont y col. (2000). Se realizaron multiplex PCR con tres pares de cebadores (sus secuencias así como el tamaño esperado de los fragmentos obtenidos se indican en la tabla 3) en la que se utilizaron 0,08 µM de cada uno. Las amplificaciones se realizaron con 12,5 µL de GoTaq Green Master Mix (2X) (Promega, USA) utilizando como molde 1 µL del lisado bacteriano (apartado III.1) y un termociclador TECHNE TC-512 (Bibby Scientific, RU) programado de la siguiente manera: desnaturalización inicial 5 min a 95°C, seguida de 30 ciclos de: 5 s a 95°C, 10 s a 59°C y 30 s a 72°C; la extensión final fue de 5 min a 72° C. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v) conteniendo GelRed (Biotium, USA). Se usó un marcador de peso molecular de 50 pb (DNA Ladder GeneRuler de Thermo Fisher Scientific, USA) para reconocer los tamaños de los productos obtenidos.



### 2.3 Evaluación de resistencia antimicrobiana

Se evaluó la resistencia a antibióticos (ATB) de *E. coli*, siguiendo la normativa descripta por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI por sus siglas en inglés, anteriormente NCCLS, 2012) para la técnica de difusión por disco (método Kirby-Bauer) en agar Mueller-Hinton (apartado 4.3). Asimismo, se evaluó la producción de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Los antibióticos ensayados se indican en la **tabla 1**.

**Tabla 1. Discos antibióticos utilizados para evaluar la resistencia antimicrobiana**

Antimicrobianos ensayados	Carga	Grupo al que pertenecen
Amoxicilina/ácido clavulánico (AMC)	30 $\mu$ g	Penicilina de espectro ampliado + inhibidor de $\beta$ -lactamasa
Ampicilina (AMP)	10 $\mu$ g	Penicilina de espectro ampliado
Ceftazidima (CAZ)	30 $\mu$ g	Cefalosporina de 3ra generación
Cefotaxima (CTX)	30 $\mu$ g	Cefalosporina de 3ra generación
Estreptomicina (S)	25 $\mu$ g	Aminoglucósido
Tetraciclina (TE)	30 $\mu$ g	Tetraciclina
Ciprofloxacina (CIP)	5 $\mu$ g	Fluoroquinolona
Trimetoprima/sulfametoxazol (TMS)	25 $\mu$ g	Sulfonamida

Los discos de ATB se adquirieron de Laboratorios Britania (Argentina). Las cepas de referencia *E. coli* ATCC 25922 y ATCC 35218 se usaron para control de calidad. Los aislamientos se clasificaron como sensibles (S), intermedios (I) o resistentes (R), según los criterios de CLSI. Sin embargo, solo para los análisis estadísticos, los aislados con resultados intermedios (I) se consideraron resistentes, ya que esta resistencia parcial puede indicar el primer paso hacia la resistencia completa (Gibbons y col., 2014). Los aislados con resistencia simultánea al menos a tres clases diferentes de ATB se clasificaron como multi-resistentes (MDR) (Bok y col., 2015; de Jong y col., 2014).

### III.3 Evaluación de determinantes asociados a patogenicidad en *Escherichia coli* nativas de uretra y vagina porcina

#### 3.1 Movilidad

Para evaluar la movilidad de cada aislado, a partir de un cultivo *overnight* se sembró una colonia en un punto en placas de Petri conteniendo LB agar al 0,3%; después de incubar a 37°C durante 8 h, se midió el diámetro de la migración de las bacterias a través del agar, tomando como centro el punto de inoculación en la placa. Se realizó por triplicado, se promediaron las medidas obtenidas y este valor se consideró para categorizar los resultados (Tabla 2).

**Tabla 2. Categorías de movilidad según diámetro desarrollado**

Movilidad	mm (diámetro)
Inmóvil (I)	0 – 5
Baja (Mb)	5,1 – 15
Media (Mm)	15,1 – 30
Alta (Ma)	>30

#### 3.2 Presencia de Fimbria P y pili tipo I.

Se evaluó mediante la aglutinación de células de *Saccharomyces cerevisiae* y la hemoaglutinación de glóbulos rojos humanos tipo A. Se prepararon suspensiones bacterianas con  $10^{12}$  UFC/mL ( $DO_{540nm}=1,2$ , en PBS) a partir de cultivos *overnight* en caldo LB (medio Luria Bertani) de cada aislado. Para la evaluación de la expresión de la fimbria tipo 1, las levaduras fueron lavadas y suspendidas en PBS ( $DO_{540nm}=1,2$ ). Luego, se mezclaron 50  $\mu$ L de cada suspensión (bacterias y levaduras) en un portaobjetos de vidrio durante 5 min. La visualización de agregados se consideró aglutinación positiva (Schembri y col., 2000). La presencia de la fimbria P se comprobó utilizando 50  $\mu$ L de una suspensión de glóbulos rojos al 5% en PBS, mezclados en un portaobjetos con igual volumen de la suspensión bacteriana ( $DO_{540nm}=1,2$ , en PBS); después de 5 min se evaluó la formación de agregados celulares (Jadhav y col. 2011). Todos los aislados de *E. coli* que resultaron positivos en estos ensayos, se evaluaron nuevamente pre incubando las suspensiones bacterianas con 1%  $\alpha$ -metil-D-manopiranosas durante 30 min a temperatura ambiente. Aquellos aislados en los que la adición de  $\alpha$ -metil-D-manopiranosas disminuyó o anuló la aglutinación de las levaduras se consideraron positivos para la expresión de la adhesina del pili tipo 1 (FimH) y se clasificaron como PS (aglutinación positiva sensible a manosa), mientras que los aislados que conservaron su capacidad de aglutinación se clasificaron como PR (aglutinación positiva resistente a manosa). La aglutinación PR de GR suele indicar la expresión de fimbria P.

### 3.3 Formación de fimbria curli y/o celulosa

La capacidad de los aislados de *E. coli* de producir fimbria curli y/o celulosa fue estudiada en suspensiones bacterianas ( $DO_{540nm}=1,0$  en PBS) obtenidas a partir de un cultivo *overnight* en agar LB sin NaCl a 37°C. La expresión de la fimbria se puso en evidencia inoculando 2 mL de caldo LB (sin NaCl) con 30  $\mu$ L de cada suspensión bacteriana. Luego de ser incubadas (3 h, 37°C) en agitación, 5  $\mu$ L de cada cultivo se sembraron en un punto sobre placas de agar LB (sin NaCl) suplementado con Rojo Congo (40  $\mu$ g/mL) y Azul de Bromofenol (20  $\mu$ g/mL). Después de 48 h de incubación a 30°C, los aislados se clasificaron de acuerdo a los morfotipos descritos previamente (Römling 1998; Bokranz 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).

El Rojo Congo se une específicamente a fimbrias amieloides, como la fimbria curli; sin embargo está reportado que pueden 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 segunda clasificación, tomando como Rojo Congo positivo (RC+) aquellos aislados que expresaron fimbria curli y/o celulosa (morfotipos rdar, pdar, bdar y bas) y como Rojo Congo negativo (RC-) aquellas colonias que no expresaron ni fimbria curli, ni celulosa (morfotipo saw).

### 3.4 Formación de biofilm

La capacidad de formar biofilm sobre superficies abióticas (vidrio y poliestireno) se determinó según la metodología descrita previamente (Römling y col., 1998; Hussain y col., 2012) con algunas modificaciones. 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  $\mu$ L de cada suspensión bacteriana en 3 mL de LB sin NaCl (dilución 1:100) y se incubaron durante 48 h a 30°C sin agitación. Para la formación de biofilm sobre poliestireno, se sembraron 200  $\mu$ L de la suspensión bacteriana en cada pocillo de microplacas de poliestireno y se incubaron en las mismas condiciones que los tubos de vidrio (se realizó por cuadruplicado). Finalizado el tiempo de incubación, el medio fue aspirado y los biofilms de pocillos y tubos se lavaron dos veces con PBS. A continuación, se tiñeron con solución de Cristal Violeta 0,1% (p/v) durante 30 min, se lavaron con agua destilada y se secaron al aire. Posteriormente, se añadió etanol 96° a cada pocillo y tubo y se incubaron durante 15 min para eluir el colorante. Para la cuantificación del biofilm se midió la densidad óptica ( $DO_{590nm}$ ) del colorante re-solubilizado. En cada ensayo se incluyeron controles negativos (pocillos o tubos, según correspondiese) con medio LB sin NaCl y sin inocular, el mismo fue usado como blanco en el momento de la medición de DO.

Se utilizó como control positivo uno de los aislados de mayor producción de biofilm. El valor del biofilm se calculó según lo descrito por Stepanović y col. (2007):

$$\text{Valor biofilm} = \text{DO}_{\text{p. cepa}} - \text{DO}_{\text{cut off}}$$

$\text{DO}_{\text{p. control}}$  → promedio de las mediciones de DO de todos los controles

$\text{DO}_{\text{p. cepa}}$  → promedio de las mediciones de DO de cada cepa

$\text{DS}_{\text{control}}$  → desvío estándar de  $\text{DO}_{\text{p. control}}$

$$\text{DO}_{\text{cut off}} = \text{DO}_{\text{p. control}} + (3 \times \text{DS}_{\text{control}})$$

Los resultados se informaron según los criterios que se indican a continuación:

$\text{Valor biofilm} \leq \text{DO}_{\text{cut off}} \rightarrow$  **No forma biofilm**

$\text{DO}_{\text{cut off}} < \text{Valor Biofilm} \leq 2 \times \text{DO}_{\text{cut off}} \rightarrow$  **forma biofilm débilmente**

$2 \times \text{DO}_{\text{cut off}} < \text{Valor Biofilm} \leq 4 \times \text{DO}_{\text{cut off}} \rightarrow$  **forma biofilm moderadamente**

$4 \times \text{DO}_{\text{cut off}} < \text{Valor Biofilm} \rightarrow$  **alto formador de biofilm**

### 3.5 Detección de genes asociados a factores de virulencia (FV)

Se evaluó la presencia de genes asociados a FV característicos de cepas patógenas intestinales y extraintestinales. Los cebadores utilizados, sus temperaturas de *annealing*, así como el tamaño esperado para cada producto se describen en la **tabla 3**.

Como control positivo se utilizaron las siguientes cepas de *E. coli*: BEN2908 (APEC *fimH*; *iutA*; *ibeA*); 536 (ECPU *sfaS*; *fyuA*; *csgA*); BEN312 (ECPEX *papC*, *afa*); EDL933 (ECTS *eae*, *agn43*), B41 (ETEC *F5*; *F41*; *STa*); HdN3 (ECPU *hlyA*; *cnf1*; *traT*; *kpsMT II*, *papAH*).

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

La mezcla de reacción en todos los casos fue de: 2 µL de lisado bacteriano (apartado III.1), 2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, buffer de reacción TAS 1X, 2 U T-Plus ADN Polimerasa (Higway, Argentina), 0,6 mM de cada cebador y ALN c.s.p. 25 µL. Las condiciones de la reacción fueron:

Desnaturalización inicial	4 min a 94°C	} 25 ciclos
Desnaturalización	30 s a 94°C	
<i>Annealing</i>	30 s a T° <i>annealing</i> ( <b>tabla 3</b> )	
Extensión	2 min a 72°C	
Extensión final	5 min a 72°C	

Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 0,8% (p/v), adicionado con GelStain (Transgen Biotech, China). Las bandas se visualizaron en un sistema de foto-documentación bajo iluminación UV.

**Tabla 3. Cebadores utilizados para la caracterización de *E. coli***

Gene(s)	Secuencias de Cebadores (5' - 3')	T° annealing	Tamaño (bp)	Referencia
<i>uid A</i>	TGTTACGTCTGTAGAAAGCCC AAAACCTGCCTGGCACAGCAATT	58°C	154	Bej y col., 1991
<i>chuA</i>	GACGAACCAACGGTCAGGAT TGCCGCCAGTACC AAAGACA	58°C	279	Clermont y col., 2000
<i>yjaA</i>	TGAAGTGTGAGGAGACGCTG ATGGAGAATGCGTTCTCAAC	58°C	211	Clermont y col., 2000
TspE4C*	GAGTAATGTCGGGGCATTCA CGCGCCAACAAAGTATTACG	58°C	152	Clermont y col., 2000
<i>eae</i>	GGAACGGCAGAGGTTAATCTGCAG GGCGCTCATCATAGTCTTTC	55°C	775	Blanco y col., 2004
<i>F41</i>	GCATCAGCGGCAGTATCT GTCCCTAGCTCAGTATTATCACCT	50°C	380	Frank y col., 1998
<i>F5 (K99)</i>	TATTATCTTAGGTGGTATGG GGTATCCTTTAGCAGCAGTATTC	50°C	314	Frank y col., 1998
<i>STa</i>	GCTAATGTTGGCAATTTTATTCTGTA AGGATTACAACAAAGTTCACAGCAGTAA	50°C	190	Frank y col., 1998
<i>fimH</i>	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	63°C	508	Johnson y Stell 2000
<i>sfa/focDE</i>	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	63°C	410	Johnson y Stell 2000
<i>papC</i>	GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	61 °C	328	Moulin-Schouleur 2006
<i>papAH</i>	ATGGCAGTGGTGTCTTTTGGTG CGTCCCACCATACGTGCTCTTC	63°C	200	Johnson y Stell 2000
<i>afa/draBC</i>	GGCAGAGGGCCGGCAACAGGC CCCCTAACGCGCCAGCATCTC	63°C	559	Johnson y Stell 2000
<i>hlyA</i>	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA	63°C	1177	Johnson y Stell 2000
<i>cnf1</i>	AAGATGGAGTTTCTATGCAGGAG CATTCAGAGTCCTGCCCTCATTATT	63°C	498	Johnson y Stell 2000
<i>fyuA</i>	TGATTAACCCGCGACGGGAA CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	55°C	880	Johnson y Stell 2000
<i>iutA</i>	GGCTGGACATCATGGAACTGG CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	63°C	300	Johnson y Stell 2000
<i>kpsMT II</i>	GCGCATTGCTGATACTGTTG CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	63°C	272	Johnson y Stell 2000
<i>traT</i>	GGTGTGGTGCGATGAGCACAG CACGGTTCAGCCATCCCTGAG	63°C	290	Johnson y Stell 2000
<i>agn43</i>	CTGGAAACCGGTCTGCCCTT CCTGAACGCCAGGGTGATA	58°C	433	Klemm y col., 2004
<i>csgA</i>	ACTCTGACTTGACTATTACC AGATGCACTCTGGTCAAC	55°C	200	Maurer y col., 1998
<i>ibeA</i>	TGAACGTTTCGGTTGTTTTG TGTTCAAATCCTGGCTGGAA	55°C	814	Germon y col., 2005

## VI. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS POTENCIALMENTE BENÉFICOS

### IV.1 Aislamiento de bacterias lácticas (BL) a partir de muestras vaginales y uretrales porcinas

#### IV.1.1 Aislamiento y conservación

Los *citobrush* de todas las muestras uretrales y vaginales (apartado I.2), se colocaron en tubos con 3 mL de caldo MRS pH 5,5 y se incubaron a 37°C durante 72 h, para favorecer el crecimiento de las BL. De los tubos que presentaron crecimiento, se tomaron alícuotas y se sembraron en placas de MRS agar pH 5,5. Asimismo, se utilizaron las placas de MRS agar pH 5,5 provenientes de muestras vaginales sin enriquecer (apartado II.3.1).

Posteriormente, se eligieron al azar hasta cuatro colonias/muestra, se transfirieron a caldo MRS y se incubaron a 37°C hasta 72 h, se realizaron tinciones de Gram, reacción de catalasa, pruebas de producción de indol y de reducción de nitrato. Los aislados Gram positivo, catalasa negativa, indol negativo y nitrato negativo se consideraron como BL presuntivas (BLp) y se conservaron en caldo MRS adicionado con 20% de glicerol (a -20°C).

#### IV.2 Análisis RAPD-PCR (Amplificación aleatoria de ADN polimórfico)

Para las reacciones de RAPD-PCR se utilizó el ADN bacteriano obtenido según el protocolo de Pospiech y Neumann (1995) y el cebador M13 (5'-GAG GGT GGC GGT TCT-3') (Fontana y col. 2005). El protocolo de amplificación fue de 5 min a 94°C de desnaturalización inicial seguida de 40 ciclos de: 1 min a 94°C, 20 s a 45°C y 2 min a 72°C, y extensión final de 10 min a 72°C. La amplificación se realizó en un termociclador TECHNE TC-512 (Bibby Scientific, RU). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 µL conteniendo 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 µL de tampón 5X (Inbio Highway), 1,0 µL de dNTPs 5 mM (Inbio Highway), 1,25 µM del cebador, 1,0 U T-Free ADN polimerasa (Inbio Highway) y 2,5 µL de una suspensión de ADN molde, o ALN como control negativo de templado. Los productos de RAPD se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 3% adicionado con GelRed (Biotium, USA) a 121 volts durante 3,5 h. Los geles se visualizaron en un sistema de foto-documentación bajo iluminación UV. Los perfiles RAPD fueron normalizados y sometidos a análisis con la aplicación de Java denominada GelJ (Heras y col., 2015). El coeficiente de correlación de Pearson se utilizó para calcular las similitudes entre los patrones de RAPD. Los dendrogramas fueron generados sobre la base del método de agrupación por pares no ponderado utilizando promedios (UPGMA).

### IV.3 Evaluación de la capacidad de producción de sustancias antimicrobianas

#### IV.3.1 Evaluación de la actividad antagonica (AA)

Se trabajó según la técnica de “Mota en el césped” desarrollada por Lewus y Montville (1991) con pequeñas modificaciones. Los aislados a partir de medio MRS, se cultivaron en caldo LAPTg (*overnight*). Posteriormente se tomaron alícuotas (20 µL) que se sembraron en *spot* (gota) en una placa de agar LAPTg y se incubó (18-24 h) hasta observarse el desarrollo de colonias prominentes. Posteriormente se realizó la siembra del microorganismo indicador (**Tabla 4**), preparado como se describe a continuación: a partir de un cultivo *overnight* en Agar Sangre (A.S) se realizó una suspensión en SF estéril y se ajustó la D.O.<sub>625 nm</sub> entre 0,08 y 0,1 (lo que se corresponde con el 0,5 de la escala de Mac Farland). Finalmente se colocó una alícuota (100 µL) de dicha suspensión en 15 mL de MH agar fundido, se mezcló en vortex y se vertió sobre las placas conteniendo las “súper colonias”, contiguo a las mismas previamente, se había colocado una gota (5 µL) de solución de tripsina (1mg/mL). Finalmente, se Incubó 18 h a 37°C y la actividad inhibitoria se detectó por la presencia de halos de inhibición alrededor de las colonias. La disminución del halo de inhibición en la zona de la gota de tripsina puso en evidencia la presencia de una sustancia antimicrobiana de naturaleza peptídica.

**Tabla 4. Microorganismos utilizados como indicadores de la actividad inhibitoria**

Microorganismos	Origen
<i>Listeria monocytogenes</i> (sensible a bacteriocina de <i>Enterococcus gallinarum</i> CRL 1826)	Carne Vacuna
<i>Escherichia coli</i>	Uretra de cerda del grupo E con infección urinaria.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Vagina de cerda del grupo E con descarga vulvar
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Uretra de cerda del grupo E con descarga vulvar.
<i>Enterococcus faecium</i>	Vagina de cerda del grupo E repetidora de celo.
<i>Bacillus pumilus</i>	Vagina de cerda del grupo E con descarga vulvar

#### IV.3.2 Naturaleza química de la/las sustancia/s antimicrobiana/s que inhiben el crecimiento de *Escherichia coli* LEMSA 7736

Para establecer la naturaleza química de el/los metabolito/s producido/s por las potenciales BL que están involucrados en la inhibición de *E. coli* LEMSA 7736, se trabajó con células del microorganismo patógeno y con sobrenadantes libres de células (SLC) de las potenciales BL (BLp).

Cada BLp ensayada, luego de 3 pases sucesivos, fue inoculada al 2% en caldo LAPTg e incubada a 37°C. Fracciones de estos cultivos se centrifugaron a 14.000 rpm durante 10 min a 4°C para obtener el SLC que se conservado en frío (4°C) hasta su procesamiento. Una colonia de *E. coli* LEMSA 7736 se sembró por estriado en LAPTg agar (1,5%) y se incubó a 37°C durante 12 h, luego se realizó una suspensión en solución fisiológica al 0,5 de la escala de Mc Farland (D.O. 625 nm entre 0,08 - 0,1).

En una microplaca de poliestireno de 96 pocillos se dispusieron 80 µL de medio fresco (LAPTg caldo) a los que se adicionaron 100 µL del SLC de la BLp sometido a diferentes tratamientos:

- A. Crudo (sin tratar).
- B. Neutralizado (N).
- C. Sobrenadante N, tratado con 0,5 mg/mL de catalasa durante 1 h a 25°C.
- D. Sobrenadante N, tratado con 1 mg/mL de tripsina en solución Tris-HCl 0,05 M + CaCl<sub>2</sub> 1 M, pH 8,0 durante 1 h a 37°C.
- E. Sobrenadante N tratado primero con catalasa y luego con tripsina, en las condiciones establecidas en los apartados precedentes.

Se utilizaron además los siguientes controles obtenidos en las mismas condiciones descriptas precedentemente:

- c1. Caldo LAPTg.
- c2. Caldo LAPTg con PBS.
- c3. Caldo LAPTg tratado con catalasa.
- c4. Caldo LAPTg tratado con tripsina.
- c5. Caldo LAPTg tratado con catalasa y tripsina.

Se dispusieron 20 µL de la suspensión de *E. coli* LEMSA 7736 en cada pocillo y se incubó a 37°C durante 6 h. Se determinó la viabilidad de la enterobacteria a los tiempos 0 y 6 h.



## **V. IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA DE AISLADOS SELECCIONADOS**

El ADN genómico se extrajo según la técnica propuesta por Pospiech y Neumann (1995). Se utilizaron cebadores oligonucleotídicos PLB16, 50-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-30 y MLB16, 50-GGCTGCTGGCACGTAGTTAG-30) para amplificar la región V1 variable del gen ribosomal RNA de 16S de acuerdo con Ruiz Rodríguez y col., (2016). Los productos obtenidos se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1% (p / v), se tiñeron y se visualizaron como se describió anteriormente. Los amplicones se escindieron del gel, se purificaron utilizando un kit de purificación de bandas de ADN de GFX PCR (GE Healthcare, Amersham, R.U) y se secuenciaron en CERELA-CONICET utilizando un secuenciador de ADN ABI 3130 (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). Se realizaron alineamientos de secuencias de genes de ARNr utilizando el método de alineamiento de secuencias múltiples y se completaron las consultas de identificación mediante una búsqueda BLAST en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/>) y en el Proyecto de base de datos Ribosomal (Cole y col., 2009). Las secuencias de ARNr 16S determinadas se enviaron a la base de datos GenBank.

## **VI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico de los resultados de la cuantificación del número de microorganismos provenientes de los diferentes grupos de animales y de los nichos estudiados, se realizó mediante el empleo del software InfoStat (versión 2008). InfoStat (2015p Version) y Minitab (versión 15).

Los resultados que presentaron una distribución normal se analizaron utilizando el modelo lineal general para el análisis de la varianza (ANOVA). Los datos se compararon con la Prueba LSD de Fisher con un nivel de confianza de 95%.

Cuando los resultados no mostraron una distribución normal, las diferencias significativas entre los valores medios se determinaron aplicando el análisis de la varianza no paramétrico con la Prueba de Kruskal Wallis (nivel de confianza de 95%).

Las asociaciones entre los resultados categóricos se analizaron mediante la Prueba exacta de Fisher ( $p < 0,05$ ).



## CAPÍTULO 1

ESTUDIOS DE LAS COMUNIDADES  
MICROBIANAS AUTÓCTONAS DE  
VAGINA Y URETRA DE **CERDAS** EN  
DIFERENTES SITUACIONES DEL  
MANEJO REPRODUCTIVO.

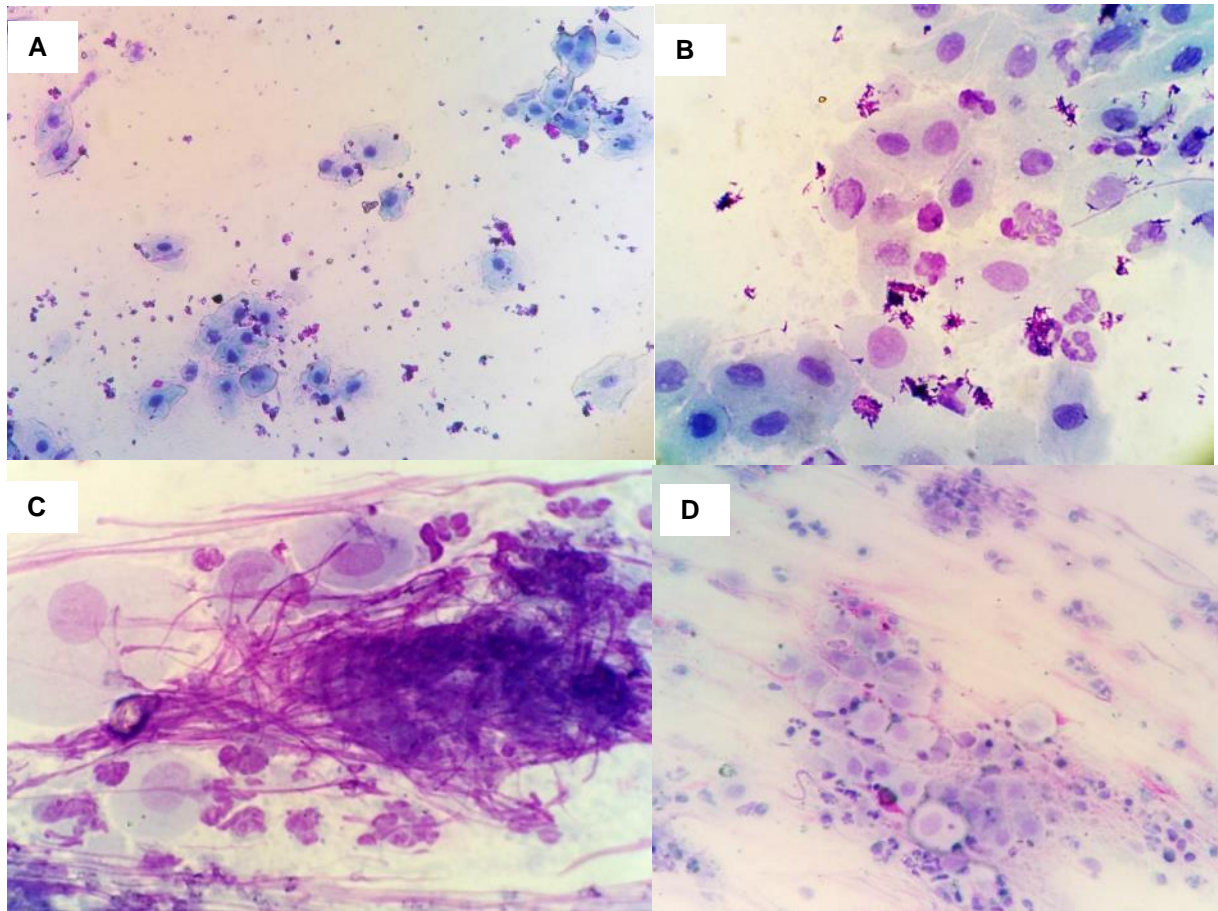
### **1.1 Cerdas sanas: evaluaciones por vaginoscopia y citología de las mucosas del tracto urogenital (TUG) de cachorras y cerdas preñadas**

A fin de realizar las evaluaciones por vaginoscopia y citología de la mucosa vaginal así como de la microbiota del TUG de cerdas, se seleccionaron las siguientes categorías de animales:

- 10 cachorras vírgenes en edad de ser servidas (grupo **CV**),
- 10 cerdas preñadas por servicio natural (grupo **SN**),
- 10 cerdas preñadas por inseminación artificial (grupo **IA**),

Las muestras se tomaron de la región craneal de vagina y de la pared uretral anterior (Materiales y Métodos, apartado I.2). Todas las hembras fueron criadas en un sistema mixto, es decir en corrales con refugios y acceso a pasturas, con un sector de maternidad diferenciado.

En todos los casos la evaluación vaginoscópica mostró una mucosa de aspecto normal sin congestión ni descarga. El pH vaginal osciló entre 7-7,5 sin encontrarse diferencias entre los grupos cachorras y preñadas. Mediante la evaluación citológica del material obtenido se determinó el grado de inflamación de la mucosa vaginal (Materiales y Métodos, apartado I.3). La citología arrojó valores similares en ambos grupos de cerdas preñadas (SN e IA). Todas las cerdas preñadas, salvo una del grupo SN, mostró algún grado de inflamación, a pesar de presentar una mucosa de aspecto normal al examen vaginoscópico. De ellas el 63% (12) presentó nidos de leucocitos (+++). Con respecto a las cachorras, en el 60% de los animales no se observaron signos de inflamación al examen citológico (+), en el 40% restante se observaron leucocitos libres (++) o formando parte de colgajos celulares sin perder su morfología característica (**Fig. 9**).



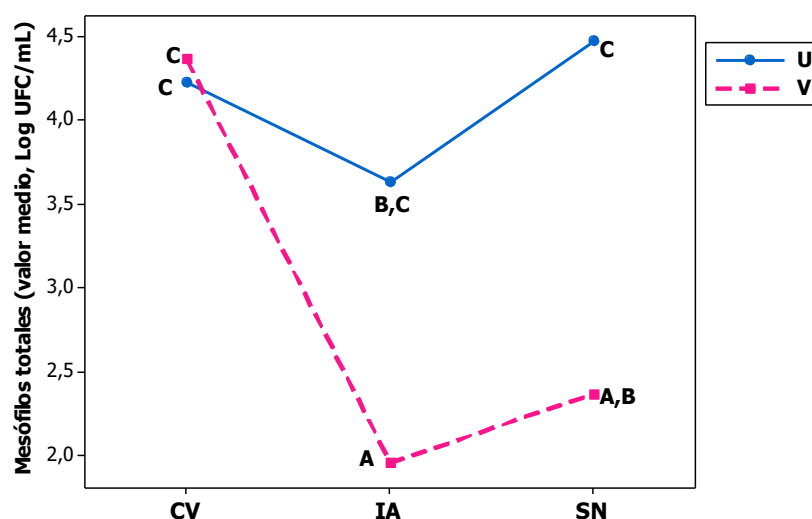
**Figura 9: Citología vaginal de cerdas sanas.** Tinción de Giemsa. **A)** Muestra de cachorra: células epiteliales conservadas, fondo límpido (sin moco) y presencia de bacterias (400x). **B)** Muestra de cachorra: colgajo de células epiteliales conservadas, con algunos neutrófilos, fondo límpido (sin moco) y bacterias (1000x). **C)** Muestra de cerda preñada: células epiteliales conservadas, abundantes neutrófilos en nido con fibrina (1000x). **D)** Muestra de cerda preñada: células epiteliales conservadas en colgajos con neutrófilos, nido de leucocitos y fibrina (400x).

## 1.2. Evaluación de la microbiota autóctona del tracto urogenital (TUG) porcino mediante estudios microbiológicos dependientes de cultivos

### 1.2.1 Mesófilos totales en uretra (U) y vagina (V) porcina

Se determinó la carga de microorganismos mesófilos en muestras de mucosas uretral y vaginal de cachorras (CV) y cerdas preñadas (IA y SN) a partir de los recuentos obtenidos en LAPTg agar y A.S (Materiales y Métodos, apartado II.1.1). En general, se observó que el recuento uretral no presentó diferencias significativas entre los diferentes grupos evaluados. En cambio, los valores relevados a partir de muestras vaginales de hembras preñadas (IA:  $1,7 \pm 2,3$  y SN:  $2,4 \pm 2,2$  Log UFC/mL) fueron significativamente menores ( $p < 0,05$ , Prueba LSD Fisher) que aquellos encontrados en el grupo CV ( $4,2 \pm 1,9$  Log UFC/mL) (**Fig.10**).

Al comparar la colonización en ambos nichos (V y U) para cada grupo, no se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ , Prueba LSD de Fisher) en el grupo CV (V:  $4,23 \pm 1,9$  Log UFC/mL; U:  $4,22 \pm 0,24$  Log UFC/mL). Sin embargo en los grupos de preñadas por SN (V:  $2,37 \pm 2,2$  Log UFC/mL; U:  $4,47 \pm 0,3$  Log UFC/mL) y preñadas por IA (V:  $1,7 \pm 2,3$  Log UFC/mL; U:  $3,63 \pm 0,5$  Log UFC/mL) fue significativamente mayor la colonización uretral (U) que la vaginal (V) ( $p < 0,05$ , Prueba LSD de Fisher) (**Fig.10**).

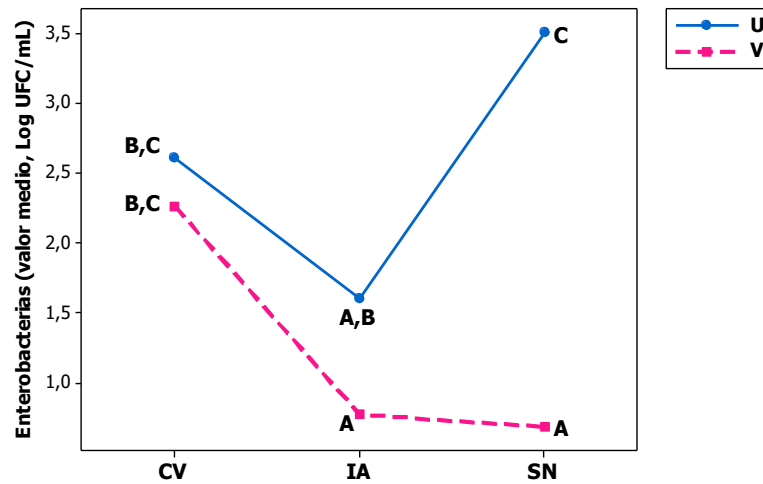


**Figura 10: Recuentos (valores medios) de mesófilos totales (Log UFC/mL) en uretra (U) y vagina (V) de cachorras (CV) y cerdas preñadas por inseminación artificial (IA) y por servicio natural (SN).** Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ , Prueba LSD de Fisher).

### 1.2.2. Enterobacterias en uretra (U) y vagina (V) porcina

Asimismo se determinó la carga de enterobacterias en muestras de mucosas uretral y vaginal de cachorras (CV) y cerdas preñadas (IA y SN) a partir de los recuentos obtenidos en MC (Materiales y Métodos, apartado II.1.1). No se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$  Prueba LSD de Fisher) en muestras de U y V en CV (V:  $2,26 \pm 1,5$  Log UFC/mL; U:  $2,61 \pm 1,8$  Log UFC/mL) y preñadas por IA (V:  $0,77 \pm 1,0$  Log UFC/mL; U:  $1,6 \pm 1,3$  Log UFC/mL). Por el contrario, el recuento fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ , Prueba LSD de Fisher) en U que en V para el grupo de cerdas preñadas por SN (V:  $0,68 \pm 1,5$  Log UFC/mL; U:  $3,51 \pm 0,6$  Log UFC/mL) (**Fig. 11**).

Al comparar los diferentes grupos se observó que el recuento de enterobacterias en V de cerdas preñadas (IA y SN) fue significativamente menor que en CV ( $p < 0,05$ , Prueba LSD de Fisher). Los recuentos uretrales de enterobacterias en el grupo CV y SN fueron significativamente mayores que en cerdas preñadas por IA ( $p < 0,05$  Prueba LSD de Fisher) (**Fig. 11**).

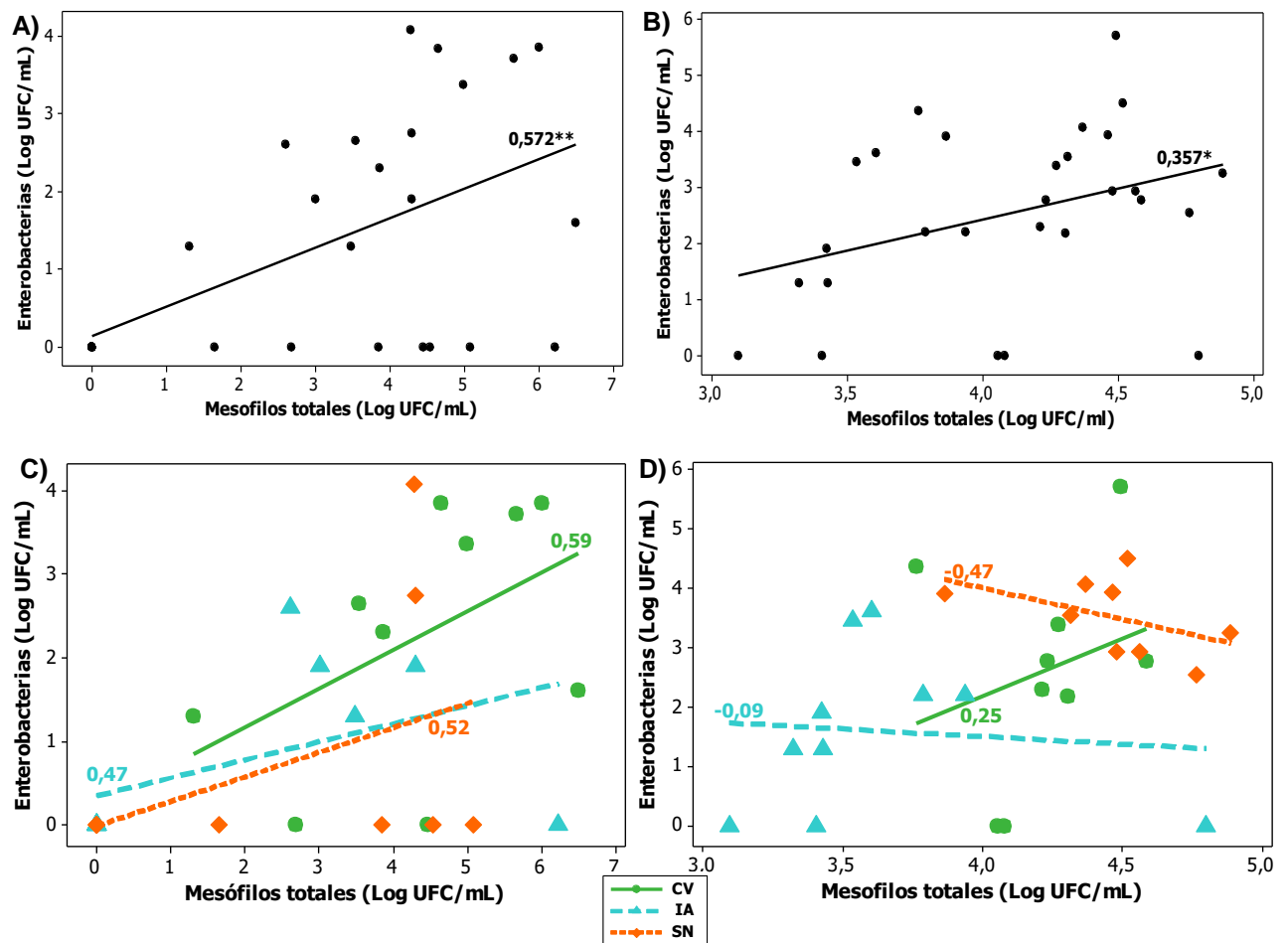


**Figura 11: Recuentos (valores medios) de enterobacterias (Log UFC/mL) en uretra (U) y vagina (V) de cachorras (CV) y cerdas preñadas por inseminación artificial (IA) y por servicio natural (SN). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ , Prueba LSD de Fisher).**

### 1.2.3. Relación enterobacterias y mesófilos totales

A fin de determinar si la colonización por enterobacterias respondió al incremento en la colonización total de microorganismos o si existió colonización preferencial por las mismas en alguno de los nichos, se determinó la correlación entre los recuentos de ambos grupos microbianos en U y V (**Fig.12 A y B**). El coeficiente de Pearson calculado correspondiente a U fue de 0,357 ( $p < 0,1$ ) mientras que para V fue de 0,572 ( $p < 0,005$ ), lo que indica una mayor correlación entre los dos parámetros evaluados en este último nicho. Es decir que la mayor presencia de enterobacterias puede estar asociada a una mayor tendencia a la colonización microbiana en el ecosistema vaginal. Una situación diferente parece tener lugar en U donde se observa una mayor presencia de enterobacterias y la misma parece ser independiente del grado de colonización microbiana total de esta mucosa.

Cuando se analizó esta correlación en cada categoría animal, en V no se observan diferencias entre los tres grupos de animales (**Fig.12 C**); sin embargo la situación en U difiere según se trate de cachorras (CV) o preñadas (SN, IA). En estas últimas la colonización por enterobacterias tiende a ser independiente de la de mesófilos totales (coeficiente de Pearson: -0,47 y -0,09 para SN e IA, respectivamente) (**Fig.12 D**).



**Figura 12: Relación entre enterobacterias y mesófilos totales presentes en vagina y uretra porcina.** En el total de muestras de V (A) y U (B) y en las diferentes categorías de cerdas para V (C) y U (D). En cada caso se indica el coeficiente de correlación de Pearson y la significancia estadística (\*\* $p < 0,005$ ; \* $p < 0,1$ ).

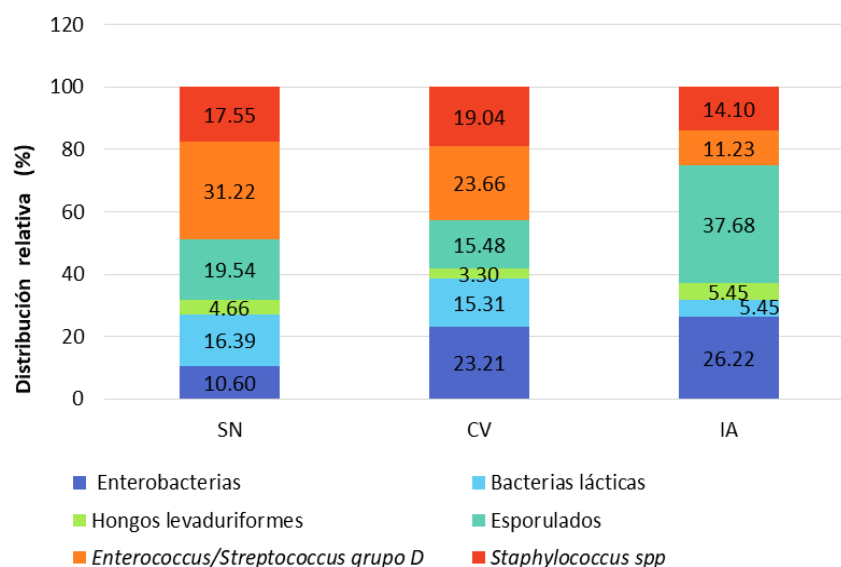
#### 1.2.4. Vagina porcina: poblaciones microbianas nativas

Los recuentos obtenidos en los medios selectivos permitieron evaluar las siguientes poblaciones de la microbiota cultivable vaginal: enterobacterias, bacterias lácticas (BL), *Enterococcus/Streptococcus* Grupo D, estafilococos, esporulados y hongos levaduriformes (Materiales y Métodos, apartado II.1.1).

Los valores de los recuentos de las diferentes poblaciones permitieron calcular la distribución relativa de las mismas (Fig. 13), se observó que estafilococos y hongos levaduriformes estuvieron presentes en similar proporción en los 3 grupos de cerdas: CV, IA y SN. *Enterococcus/Streptococcus* grupo D fue una de las poblaciones mayoritarias de los grupos SN y CV; en este último grupo se encontraron en similar proporción que las enterobacterias y en ambos grupos la población menos numerosa fue la de hongos levaduriformes. En el caso de las cerdas preñadas por IA, las poblaciones mayoritarias fueron esporulados y enterobacterias, mientras que las minoritarias fueron las BL y los



hongos levaduriformes (<5,5%) (**Fig. 13**). La población de BL estuvo presente en proporciones superiores al 16% en los grupos CV y SN.



**Figura 13: Poblaciones microbianas en la microbiota vaginal porcina:** valores medios de los recuentos (Log UFC/mL) en uretra (U) y vagina (V) de **CV** (cachorra virgen), **SN** (cerda preñada por servicio natural), **IA** (cerda preñada por inseminación artificial). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ , Prueba LSD de Fisher).

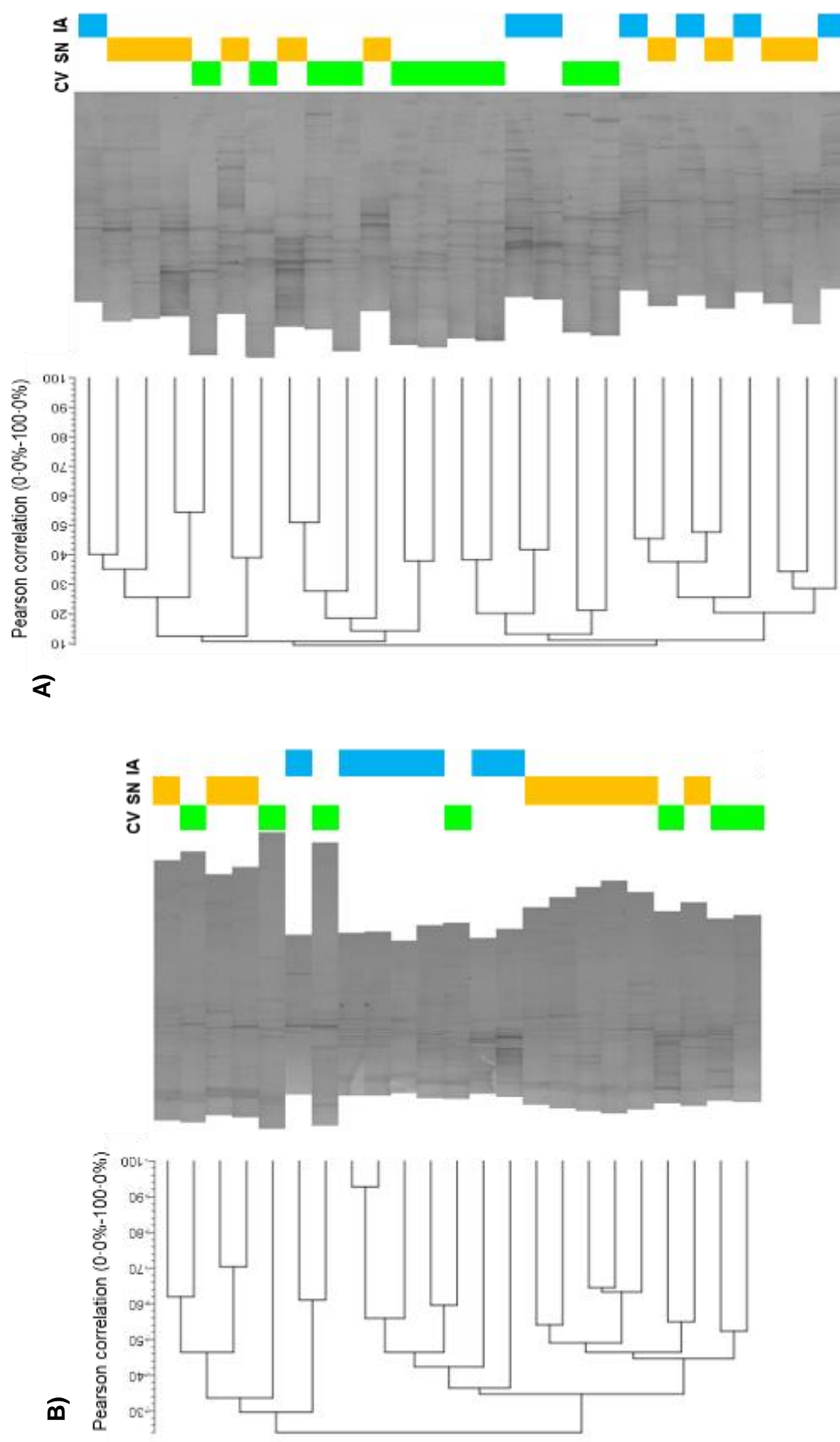
### 1.3 Evaluación de la microbiota autóctona del tracto urogenital (TUG) porcino mediante estudios independientes de cultivos: electroforesis en gel de poliacrilamida con gradiente desnaturalizante (DGGE)

#### 1.3.1 Estructura de las microbiotas residentes en las mucosas uretral y vaginal

Los dendogramas resultantes del análisis de los perfiles de bandas obtenidos por PCR-DGGE para cada muestra revelaron diferencias en la estructura de las comunidades presentes en V y U (**Fig. 14 A y B**). Así, se observó mayor similitud (Correlación de Pearson, CP: 24 a 94%) entre los patrones obtenidos en el grupo de muestras de U que entre los perfiles de V (CP: 10 a 55%).

En los perfiles de **poblaciones vaginales** la mayor similitud se observó entre los grupos CV y SN (CP: 52 y 55%, respectivamente); clústeres con similitud  $\geq 40\%$  se conformaron con muestras de cerdas preñadas tanto por SN como por IA. Otros clústeres integrados exclusivamente por muestras de CV o de cerdas preñadas (SN, IA) mostraron similitud  $\geq 35\%$ . Sin embargo en ningún caso se detectó que perfiles de microbiota vaginal de CV se asocien con los del grupo IA con similitud  $> 25\%$  (**Fig. 14 A**).

El análisis de los perfiles correspondientes a las **microbiotas uretrales** arrojó 2 clústeres con más del 50% de similitud en los que se agruparon la mayoría de las muestras de SN (50-64%) y de IA (56-92%). Las muestras de CV no se agruparon entre sí, sino que lo hicieron con muestras de cerdas preñadas por SN (similitud  $\geq 46\%$ ) y por IA (similitud  $\geq 36\%$ ). Solo dos muestras de cachorras se agruparon con un 52% de similitud. No se detectó ningún clúster con similitud interna superior a 36% que combinara perfiles de los dos grupos de cerdas preñadas (SN e IA) (**Fig. 14 B**).



**Figura 14. Perfiles de DGGE** obtenidos a partir de un fragmento del gen del 16S ARNr amplificado a partir del ADN total extraído de las microbiotas vaginal (**A**) y uretral (**B**) de cachorras y cerdas. El dendrograma muestra similitudes entre los perfiles bacterianos de **CV** (cachorra virgen), **SN** (cerda preñada por servicio natural), **IA** (cerda preñada por inseminación artificial). Los patrones se compararon con el coeficiente de correlación de Pearson mientras que la matriz de agrupación con el método UPGMA. La barra de escala indica porcentaje de similitud. La matriz a la derecha (casillas rellenas) indica el grupo al que pertenece cada muestra y los porcentajes corresponden a la mínima similitud en cada clúster.

### 1.3.2 Secuenciación de las bandas obtenidas en los perfiles de DGGE de poblaciones del TUG de cachorras y cerdas preñadas

La secuenciación de las bandas más representativas obtenidas en los patrones de DGGE de las microbiotas vaginal como uretral, y su comparación con las de las bases de datos GenBank (usando BLAST searches, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y las del Ribosomal Database Project (usando la Sequence Map tool, <http://rdp.cme.msu.edu/>) permitió asignarlas taxonómicamente al *phylum* Firmicutes.

**Poblaciones vaginales:** se aplicó un análisis de correspondencia de los géneros bacterianos encontrados (secuencias de bandas con más del 97% de homología) en las muestras vaginales de CV y cerdas preñadas (SN e IA), para determinar si se asociaban al perfil de alguno de los grupos de animales incluidos en el estudio (**Fig. 15**). Se observó que los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Bacillus* estuvieron presentes en la microbiota vaginal de CV y preñadas por SN, pero no fueron detectados en las cerdas preñadas por IA. Otros géneros, tales como *Staphylococcus* y *Anoxybacillus* estuvieron presentes solamente en las muestras vaginales de cerdas preñadas, siendo este último detectado solamente en cerdas preñadas por IA (**Fig. 15**).

En la muestras de CV se pudo identificar: *Lactobacillus graminis* (100% de homología), *Streptococcus suis* (100%), *Streptococcus hyovaginali* (99%) y *Bacillus psychrosaccharolyticus* (100%). Esta última especie fue detectada también en muestras del grupo SN. Asimismo, se identificaron *Streptococcus constellatus* (90%), *Lactobacillus fuchuensis* (100%) y *Staphylococcus capitis* (100%) en las muestras de cerdas preñadas por SN mientras que en las cerdas preñadas por IA se identificaron: *Enterococcus durans/faecium* (100%), *Anoxybacillus kestanbolensis* (100%) y *Staphylococcus epidermidis/caprae* (100%). Bandas presentes en los perfiles de este último grupo mostraron 94% de homología con *Staphylococcus equorum/haemolyticus* (**Fig. 15**).

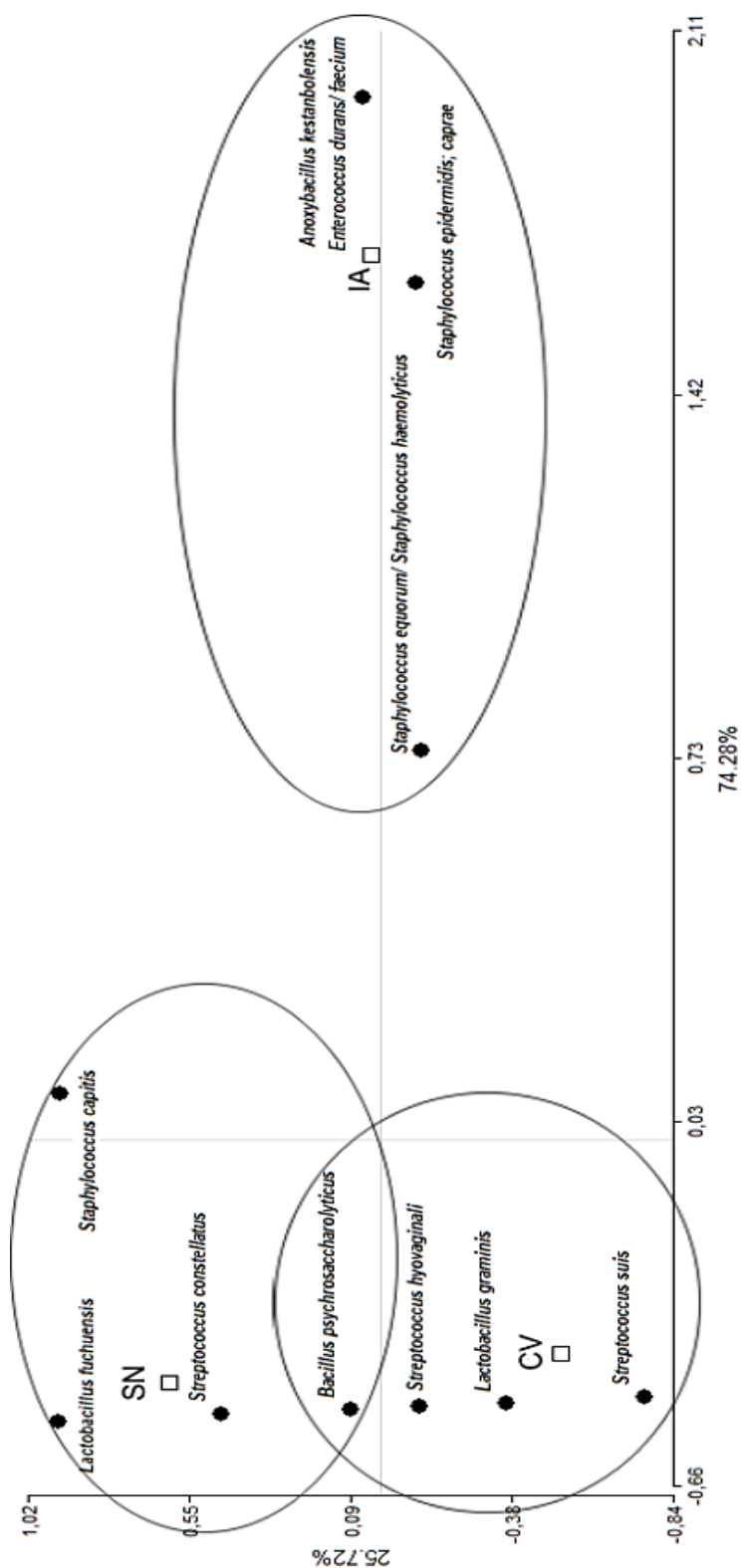
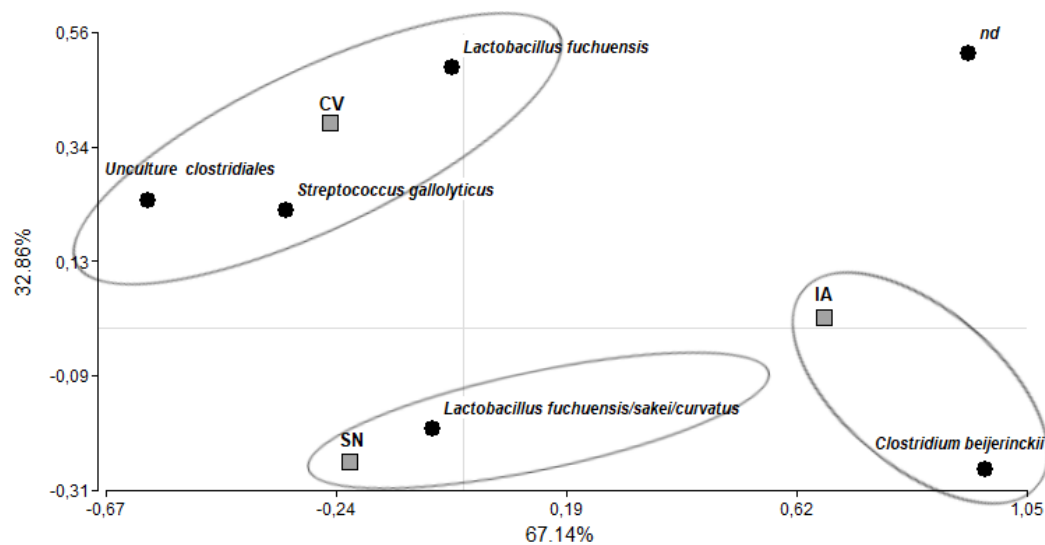


Figura 15: Análisis de correspondencia de los grupos de cerdas incluidos en el estudio (□) y las poblaciones microbianas identificadas en la microbiota vaginal (●). Se indica la contribución a Chi-cuadrado para cada uno de los ejes. CV (cachorra virgen), SN (cerda preñada por servicio natural), IA (cerda preñada por inseminación artificial)

**Poblaciones uretrales:** de las bandas obtenidas a partir de los perfiles de DGGE de muestras uretrales, pocas pudieron ser identificadas después de su secuenciación y comparación con las de las bases de datos mencionadas anteriormente. Sin embargo, al igual que lo observado en las muestras de V, en todos los casos fueron asignadas taxonómicamente al *phylum* Firmicutes.

El análisis de correspondencia de los géneros bacterianos encontrados y el origen de las muestras de U, indicó que existe una asociación entre el perfil de la hembra y las poblaciones que pueden colonizar la mucosa uretral (**Fig. 16**). En el grupo de cachorras vírgenes (CV) pudieron identificarse (secuencias de bandas con más del 99% de homología) *Lactobacillus fuchuensis/sakei/curvatus*, *Streptococcus gallolyticus*, así como Clostridiales no cultivables. *Lactobacillus fuchuensis* fue la única especie identificada en U de cerdas preñadas por SN, así como *Clostridium beijerinckii* para el grupo de cerdas preñadas por IA (**Fig. 16**).



**Figura 16:** Análisis de correspondencia de los grupos de cerdas incluidos en el estudio (■) y las poblaciones microbianas presentes en la microbiota uretral (●). Se indica la contribución a Chi-cuadrado para cada uno de los ejes. CV (cachorra virgen), SN (cerda preñada por servicio natural), IA (cerda preñada por inseminación artificial).

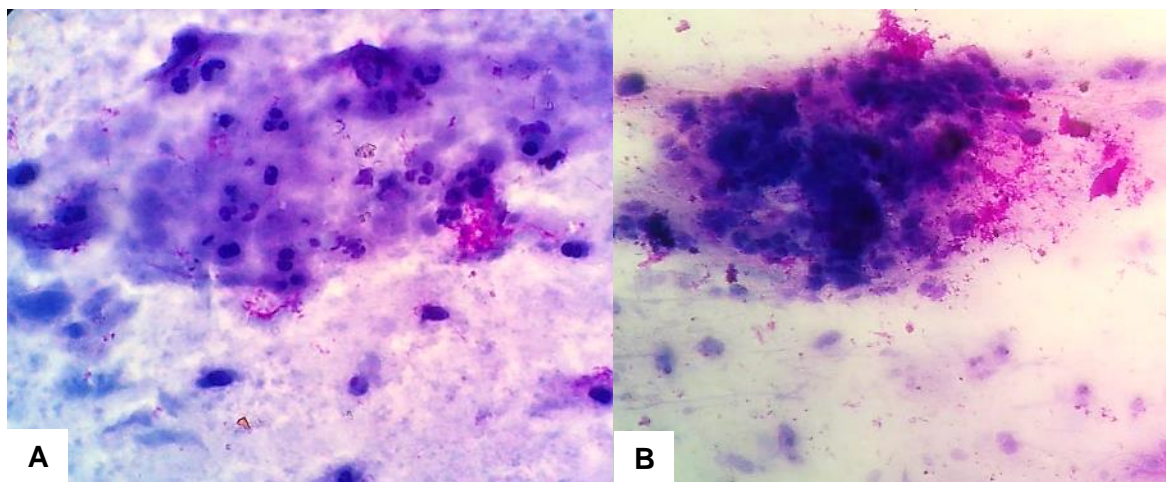
#### 1.4 Cerdas enfermas: evaluación vaginoscópica y citológica de la mucosa vaginal

A fin de evaluar la mucosa vaginal y la microbiota del TUG se seleccionaron 17 cerdas enfermas (E), grupo en el que se incluyeron animales con trastornos reproductivos como ser descarga vulvar (DV), repeticiones de celo y mastitis (**Tabla 5**).

Las muestras se tomaron de la región craneal de vagina y de la pared uretral anterior (Materiales y Métodos, apartado I.2).

En la exploración vaginoscópica el 76,5% (n=13) de las cerdas presentó una mucosa con signos de inflamación, algunas exhibieron una mucosa congestiva (o edematizada) con sangre (n=5), mientras que en el resto (n=8) se observó descarga purulenta. Solo en el 23,5% de las cerdas (n=4) se observó una mucosa normal. De éstas, 2 presentaron DV después de la micción, una tenía antecedentes de repetición de celos y la otra mastitis agalactia, por lo que se incluyeron también en el estudio (**Tabla 5**).

Mediante la evaluación citológica del material obtenido se determinó el grado de inflamación de la mucosa vaginal (Materiales y Métodos, apartado I.3). El 88,23% (n=15) de las muestras presentaron signos de inflamación observándose en los preparados: material amorfo, detritus celular, bacterias y neutrófilos con núcleos picnóticos tipo “bala de cañón”. La mayoría (n=13) de éstas se clasificaron como muestras positivas (++++) (**Fig. 17**). Asociado al elevado número de neutrófilos, se observó fibrina con exudado amorfo y detritus celular. Solamente dos muestras no mostraron signos de inflamación mediante el examen citológico (**Tabla 5**). Las mismas correspondieron a cerdas con DV pero sin signos de inflamación en la mucosa vaginal. Cabe destacar que la descarga se presentó luego de la micción, por lo que es probable que la misma haya sido de origen uretral, es decir por una infección urinaria (IU).



**Figura 17: Citología vaginal de cerdas enfermas con alto grado de inflamación (+++), tinción de Giemsa. A) Material amorfo, detritus celular, bacterias y leucocitos con núcleo picnótico tipo “bala de cañón” (1000x). B) Células degeneradas en nido y bacterias (400x).**

Aquellas cerdas (n=2) en las que se observó una mucosa normal o ligeramente congestiva pero con citología inflamatoria, correspondieron a: una hembra vacía con antecedentes de repeticiones de celo que no queda preñada y a una hembra con mastitis-agalactia. En base a estos antecedentes, dichos animales fueron incluidos en este grupo.

La comparación de los resultados obtenidos por exploración vaginoscópica y los score de inflamación de la mucosa vaginal determinado por citología, mostraron asociación positiva (Prueba exacta de Fisher,  $p=0,04$ ).

**Tabla 5. Descripción de las cerdas incluidas en el grupo E.**

Nº de identificación	Antecedentes de repetición de celo	Descarga Vulvar	Vaginoscopia	Citología
1	no	Si	Descarga purulenta	+++
2	no	Si	Mucosa congestiva con sangre	+++
3	no	Si	Mucosa congestiva con sangre	+++
6	si	No	Normal	+++
26	no	Si	Descarga purulenta	+++
27	no	Si	Mucho moco con trazas de pus.	+++
29	no	Si	Descarga purulenta abundante	+++
30	no	Si	Descarga purulenta abundante	+++
31	si	Si	Mucosa congestiva con sangre	+++
32	si	Si	Mucosa congestiva con sangre	++
38	si	Si	Mucosa congestiva con sangre	+++
39	no	Si	Descarga purulenta	+++
E1	si	Si	Descarga purulenta	+++
E2	si	Si	Descarga purulenta	+++
E3	no	No	Normal	++
E4	no	Sí, al final de la micción	Normal	+
E5	no	Sí, al final de la micción	Normal	+

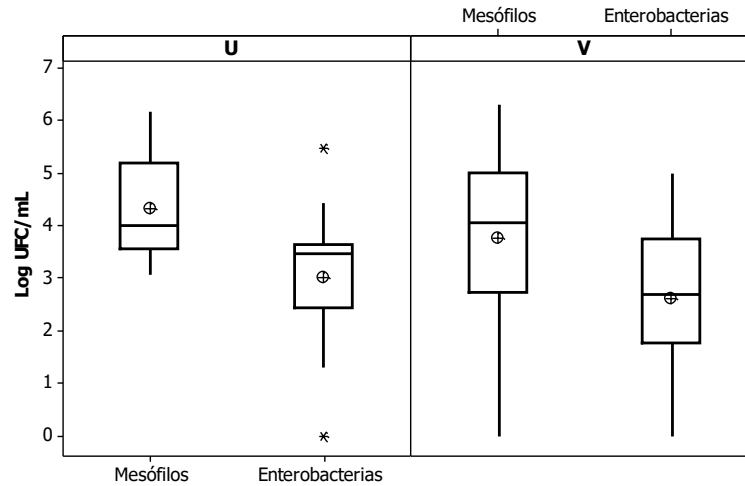
Se indica el trastorno reproductivo, resultados de la exploración vaginoscópica y grado de inflamación por citología vaginal (M y M, apartado I.3).

## 1.5 Cerdas enfermas: evaluación de la microbiota residente del tracto urogenital (TUG) mediante estudios microbiológicos dependientes de cultivos

### 1.5.1 Mesófilos totales y enterobacterias en uretra (U) y vagina (V)

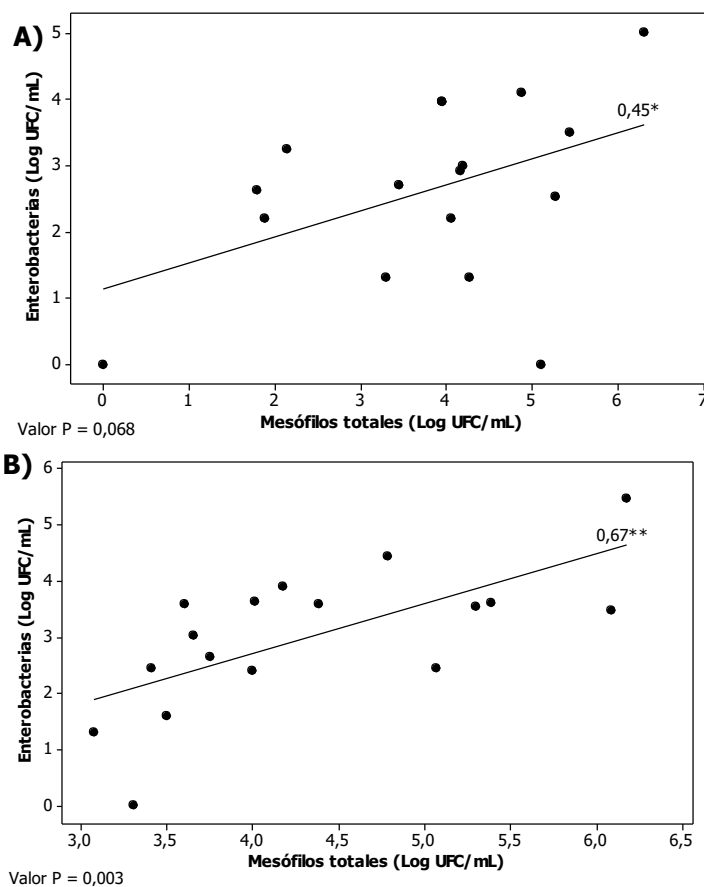
Se determinó la carga de mesófilos totales y enterobacterias en raspados de mucosas uretral y vaginal de las cerdas enfermas (Materiales y Métodos, apartado II.1.1). No se observaron diferencias significativas ( $p>0,05$  Prueba LSD de Fisher) entre los recuentos de mesófilos en ambos nichos (V:  $3,77\pm 1,6$  Log UFC/mL; U:  $4,34\pm 0,96$  Log UFC/mL), ni de enterobacterias (V:  $2,62\pm 1,4$  Log UFC/mL; U:  $3,01\pm 1,3$  Log UFC/mL) (**Fig. 18**).





**Figura 18: Recuento de enterobacterias y mesófilos totales presentes en uretra (U) y vagina (V) de cerdas enfermas.**  $\ominus$  media. \* Valores atípicos.

A fin de evaluar si la colonización de las enterobacterias respondió al incremento en la colonización total de microorganismos, se determinó la correlación entre los recuentos de ambos grupos microbianos para U y V (**Fig. 19 A y B**).



**Figura 19: Relación entre enterobacterias y mesófilos totales presentes en V (A) y U (B) de cerdas enfermas.** En cada caso se indica el coeficiente de correlación de Pearson y la significancia estadística (\*\* $p < 0,005$ ; \* $p < 0,1$ ).

En ambos nichos se observó correlación positiva entre los recuentos de enterobacterias y su correspondiente de microorganismos mesófilos. Sin embargo, dicha correspondencia fue más evidente en la mucosa uretral que en la vaginal (coeficientes de Pearson: 0,67 ( $p < 0,005$ ) y 0,45 ( $p > 0,05$ ), respectivamente). En consecuencia, en U el incremento en los recuentos de enterobacterias acompañó al aumento en la colonización total de microorganismos, mientras que en V, si bien se observó cierta correspondencia, hubo animales en los que la colonización de enterobacterias estuvo muy por debajo que la colonización total de microorganismos (**Fig. 19 A y B**).

### 1.5.2 Identificación de otras bacterias con potencial patógeno aisladas de cerdas enfermas

Se realizó la identificación de bacterias con potencial patógeno presentes en las muestras de cerdas enfermas (E). Mediante el uso de pruebas bioquímicas (Materiales y Métodos, apartado II.2) se logró identificar: *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, y por amplificación y secuenciación de la región V1 del gen del RNA ribosomal 16S (Materiales y Métodos, apartado V): *Enterococcus faecium*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Bacillus pumilus*. Además se realizó el aislamiento, identificación y caracterización de *E. coli*, resultados que se informarán y discutirán en el capítulo siguiente.

De muestras de V se aislaron:

-*S. aureus*: de 2 cerdas con citología inflamatoria, una con DV purulenta y otra repetidora de celo con vaginoscopía positiva (mucosa congestiva con sangre).

-*E. faecium*: de cerda repetidora de celo con citología inflamatoria.

-*B. pumilus*: de 2 cerdas con DV y citología inflamatoria.

De muestras de U se aislaron:

-*P. mirabilis*: de una cerda con ITU.

-*S. aureus*: de una cerda repetidora de celo.

-*S. epidermidis*: de una cerda con DV (aislado en Agar Sangre, como abundantes colonias hemolíticas).

-*S. dysgalactiae*: de 2 cerdas, una repetidora de celo y otra que presentaba DV.

## 1.7 Discusión

La productividad de un establecimiento porcicultor está íntimamente ligada a la eficiencia reproductiva de las madres y al desarrollo exitoso de sus camadas. La eficiencia reproductiva de una cerda depende del número de partos que logra por año, así como de la cantidad y calidad de los lechones que tiene por camada. El parto es un momento de alto riesgo para las cerdas, por lo que la sanidad y el bienestar de las mismas son primordiales para la rentabilidad del establecimiento porcicultor. Las cerdas deben tener condiciones ambientales confortables y un buen trato, ya que las mismas se estresan con facilidad y son propensas a padecer infecciones durante el posparto que comprometen su fertilidad y el bienestar de los lechones (Fangman y Amass, 2007; Falceto y col., 2012).

Las microbiotas residentes en las mucosas del TUG de las hembras influyen en la homeostasis del tracto y son la fuente de bacterias que colonizarán las mucosas de las crías en su pasaje por el canal de parto (Buddington y col., 2010). Un correcto equilibrio entre las poblaciones microbianas que componen la microbiota disminuye el riesgo de infecciones, mientras que un desequilibrio (disbiosis) lo aumenta (Saulnier y col., 2011; Stapleton, 2016). Este equilibrio es delicado y podría verse afectado por el tipo de servicio utilizado para lograr la preñez y el manejo de las hembras, favoreciendo la aparición de infecciones en el posparto. Es por ello que en este trabajo se estudió la microbiota del TUG de cerdas sexualmente maduras y sanas: cachorras vírgenes (CV) y preñadas por servicio natural (SN) o inseminación artificial (IA). Todas las cerdas estuvieron alojadas en un establecimiento mixto, que es lo característico de nuestra provincia.

A fin de confirmar la inflamación negativa diagnosticada por exploración vaginoscópica de estas hembras, se realizó el examen citológico de hisopados vaginales, donde si bien hubo algunas muestras que se clasificaron como positivas para inflamación por la cantidad de neutrófilos (++ o +++), ninguna presentó signos de degeneración celular ni indicios de reacción inflamatoria grave. La presencia de neutrófilos en gran número en el grupo de cerdas preñadas puede asociarse con los niveles de progesterona, hormona predominante durante la preñez. Está descrito que durante el ciclo estral, las etapas en las que predomina dicha hormona (diestro y metaestro) se caracterizan por la presencia de elevada cantidad de neutrófilos, los que pueden llegar a superar al número de células epiteliales e incluso disponerse en “nidos” (McLean y col., 2012; Quiles y Hevia, 2012; Cora y col., 2015) por lo que suponemos que las cachorras en las que detectamos un mayor número de neutrófilos pudieron estar cursando esta etapa del ciclo estral.

La metodología utilizada para la toma de muestras nos asegura haber recogido aquellas bacterias que se encontraban adheridas y colonizando las mucosas en ese momento. El grupo de CV se eligió a fin de evaluar la microbiota del TUG que aún no ha

sido intervenida a través de maniobras derivadas del manejo reproductivo de las hembras, mientras que los grupos de cerdas preñadas (SN e IA) se eligieron para estudiar si el tipo de servicio influye en la composición de la microbiota del TUG. Los estudios microbiológicos dependientes de cultivo mostraron que la carga microbiana de mesófilos totales y enterobacterias en vagina (V) resultó, contrariamente a lo esperado, menor en las cerdas preñadas que en CV. Es conocido que las condiciones fisiológicas hormonales rigen la dinámica de la colonización vaginal, tal como se ha descrito en V bovina (Otero y col., 1999, 2000); sin embargo en nuestros resultados la condición de preñez no fue suficiente para explicar el perfil de las poblaciones microbianas vaginales, ya que diferencias sustanciales se observan entre las cerdas preñadas por IA y las preñadas por SN. Tales diferencias pueden deberse, probablemente, a las condiciones generadas como consecuencia de los protocolos aplicados para la IA; los mismos incluyen antisépticos o antibióticos adicionados al semen que durante décadas han sido considerados esenciales para controlar el crecimiento bacteriano en el mismo y, así, preservar la capacidad fecundante, siendo la penicilina y la estreptomycinina la combinación antimicrobiana común para este propósito (Johnson y col., 2000).

A diferencia de lo que ocurre en humanos (Hilt y col., 2014), no tuvimos dificultades en obtener cultivos positivos de las poblaciones de uretra (U) utilizando protocolos convencionales, probablemente debido a que las muestras fueron tomadas directamente por raspado de mucosa uretral, en lugar de hacer una recuperación microbiana a partir de la orina. Se detectó que la carga de mesófilos en U fue similar entre los tres grupos de cerdas, por lo que aparentemente el manejo reproductivo no influye de igual manera que en V.

Al igual que los hallazgos informados en este trabajo de Tesis Doctoral, numerosos artículos reportaron que las enterobacterias forman parte de la microbiota comensal de V de vacas, cerdas, perras y pandas (Bara y col., 1993; Otero y col., 2000; Wang y col., 2013a; Hutchins y col., 2014; Lorenzen y col., 2015b; Gonzalez Moreno y col., 2016). Sin embargo, hasta el presente, los estudios sobre microbiota urinaria en individuos sanos no reportaron a las enterobacterias como integrantes de la misma (Hilt y col., 2014; Burton y col., 2017). En este trabajo se reporta por primera vez la presencia de enterobacterias como microorganismos comensales de la mucosa uretral de cerdas. La carga microbiana de enterobacterias en este nicho fue similar entre cachorras y cerdas preñadas.

Al evaluar la relación entre enterobacterias y mesófilos se observó que en V el aumento de la carga de enterobacterias, estuvo acompañada del aumento de la carga de mesófilos totales en los tres grupos de hembras. Esta situación se repitió en U de cachorras, pero no en las preñadas, donde la colonización de enterobacterias parece ser independiente de la de mesófilos. La situación de preñez implica una mayor susceptibilidad a las infecciones, por lo que esta dinámica de colonización en el TU debe tenerse en cuenta ya

que diferentes enterobacterias como ser *E. coli*, *Proteus* spp. y *Klebsiella* spp., son reconocidos patógenos causantes de infecciones de dicho tracto en cerdas durante el posparto (Baricco, 2011; Stalder y col., 2012).

La microbiota vaginal es la primera fuente de colonización de las crías durante el nacimiento (Buddington y col., 2010); además durante el posparto, sus poblaciones bacterianas acceden fácilmente desde este nicho hacia el útero provocando infecciones posparto como la metritis. Por esto decidimos estudiar con más detalle las poblaciones microbianas presentes en V mediante el uso de medios de cultivo específicos. Una composición similar a la informada en este trabajo fue reportada en estudios previos que describieron la presencia de *Streptococcus* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp. y *Micrococcus* spp. mediante cultivos de muestras obtenidas de la región anterior de V de cerdas adultas en la semana previa al parto y durante las 4 semanas posteriores (Bara y col., 1993). Otros autores han descrito la dinámica de colonización de algunas poblaciones microbianas como la familia *Lactobacillaceae* durante el ciclo estral en hembras Göttingen Minipigs, encontrando una menor colonización en hembras sexualmente maduras comparadas con la observada en vagina de pre-púberes (Lorenzen y col., 2015b); sin embargo no se registran estudios que planteen evaluar las diferencias en la composición de la microbiota vaginal de CV y cerdas preñadas por SN e IA, como se describe en el presente trabajo. La contribución diferencial por esporulados y enterobacterias en el ecosistema vaginal en detrimento de poblaciones potencialmente benéficas como la de las BL, tal como se observa en el patrón de las muestras del grupo IA en comparación con el de la categoría SN, podría predisponer a la prevalencia de microorganismos potencialmente patógenos. Esta situación estaría favorecida por condiciones derivadas del manejo reproductivo de las hembras, tal como se ha descrito en el caso de la microbiota vaginal humana, en la cual la disbiosis generada por factores externos como métodos anticonceptivos, actividad sexual, uso de tampones u aplicación de terapias locales, genera predisposición al desarrollo de infecciones del TUG (Stapleton, 2016; Amabebe y Anumba, 2018a; Matsumoto y col., 2018).

Para estudiar la diversidad de poblaciones bacterianas (cultivables y no cultivables) del TUG se realizó DGGE de los productos amplificados (V3 del ARN 16S) a partir del ADN total de las muestras. Así, se encontró una mayor diversidad en los perfiles vaginales comparados con los uretrales, lo que puede deberse a que el ambiente vaginal está más expuesto a factores anatómicos, hormonales y de manejo reproductivo. En nuestros resultados se observan varios clústeres conformados exclusivamente por perfiles de cachorras o cerdas preñadas (IA y/o SN), lo que puede deberse a la fuerte influencia del componente hormonal sobre la composición de la microbiota vaginal como fue descrito para bovinos (Otero y col., 1999; Gonzalez Moreno y col., 2016), primates (Miller y col.,

2017) y humanos (Stapleton, 2016), e incluso en porcinos de laboratorio, en los cuales se vio el efecto de las hormonas durante la madurez sexual de las hembras comparadas con las prepúberes donde la principal diferencia se detectó en la composición de familias pertenecientes al *phylum* Firmicutes (Lorenzen y col., 2015b).

Mediante la metodología utilizada se determinó que el 100% de los géneros bacterianos que se lograron identificar correspondieron a bacterias del *phylum* Firmicutes tanto en V como en U. Estudios realizados en cerdas Göttingen “minipigs”, por otras técnicas independientes de cultivo, detectaron que este *phylum* fue el mayoritario, representando el 60% de la microbiota vaginal (Lorenzen y col., 2015b). Asimismo Wang y col. (2017), al igual que en este trabajo, pero mediante técnicas de pirosecuenciación, informaron que el *phylum* Firmicutes fue el de mayor presencia en cerdas sanas y con endometritis, sin embargo los investigadores también encontraron los *phylums* Proteobacteria y Bacteroidetes aunque en menor proporción. Es posible que poblaciones bacterianas que hayan estado en baja proporción no fueran detectadas por las limitaciones de la técnica utilizada en este trabajo, como podría ser el caso de integrantes del *phylum* Proteobacteria que sí se lograron aislar por técnicas dependientes de cultivo.

En este trabajo de tesis se describe por primera vez a *Anoxybacillus* en un nicho con estas características, ya que los reportes que mencionan a este género hacen referencia a fuentes de aislamiento tales como muestras de aguas o fangos termales y estiércol (Pikuta y col., 2000); además, diversos trabajos describen la presencia de alguna de sus especies en productos lácteos como leche en polvo (Burgess y col., 2010). Sin embargo, nuestros resultados por primera vez lo describen en muestras obtenidas a partir de superficies mucosas de un hospedador animal; la minuciosidad y recaudos que se tuvieron en cuenta durante la toma de muestras del TUG porcino nos permiten descartar posibles contaminaciones con el medio ambiente.

Algunas especies del género *Lactobacillus* se identificaron en muestras de V de CV y cerdas preñadas por SN. Su presencia no resulta extraña ya que algunas especies han sido ampliamente descritas y caracterizadas en V bovina (Otero y col., 2000, 2006), humana (Eschenbach y col., 1989; Branco y col., 2010) y también en hembras porcinas de laboratorio (Lorenzen y col., 2015b). En un trabajo publicado recientemente se reportó la presencia de este género, así como del género *Lactococcus*, en V de cerdas, aunque no fueron los géneros más abundantes (Wang y col., 2017). Se ha informado que en mujeres embarazadas ocurre un enriquecimiento en *Lactobacillus* en la microbiota vaginal (Funkhouser y Bordenstein, 2013; Amabebe y Anumba, 2018b); en nuestros resultados no fue detectado en V de cerdas preñadas por IA; sin embargo, los cultivos con enriquecimiento previo, pusieron en evidencia la presencia de BL en las muestras vaginales de este grupo de cerdas. La salud del tracto reproductor de mujeres y también de vacas ha sido asociada a la

presencia del género *Lactobacillus* en la microbiota vaginal (Otero y col., 2006; Genís y col., 2016).

La presencia de bacterias del género *Lactobacillus* y *Streptococcus* en U porcina no sorprende ya que estos géneros han sido informados como integrantes de la microbiota uretral en humanos (Hilt y col., 2014), quienes lo describieron tanto en mujeres con síndrome de vejiga hiperactiva como en pacientes sanas, siendo mayor el porcentaje en el último grupo. Anteriormente, Siddiqui y col. (2011) utilizando técnicas independientes de cultivo, habían informado la presencia de estos dos géneros en la microbiota urinaria de mujeres sanas, aunque indicaron que los géneros predominantes fueron *Lactobacillus*, *Prevotella* y *Gardnerella*. El género *Streptococcus* también se informó como integrante de la microbiota urinaria canina (tanto en machos como hembras), sin embargo el género *Lactobacillus* parece no formar parte de dicha microbiota (Burton y col., 2017).

Varios estudios recientes sugieren que el tracto urinario alberga una microbiota única y sustancialmente diferente de las poblaciones que colonizan intestino y vagina (Siddiqui y col., 2011; Thomas-White, 2016; Burton y col., 2017). Estos hallazgos cambiaron el concepto que se tenía con respecto a la esterilidad del ambiente urinario, tanto en hombres como en mujeres (Whiteside y col., 2015). Asimismo, recientemente se ha caracterizado la microbiota urinaria canina en animales sanos, mediante estudios independiente de cultivos, advirtiéndose que la vejiga no es un ambiente estéril y posee su propia microbiota, característica y diferente de la microbiota rectal y genital (Burton y col., 2017). Las cachorras y cerdas preñadas que se incluyeron en el presente estudio no presentaron signos de pielonefritis o cistitis; sin embargo los raspados de la mucosa uretral arrojaron resultados positivos tanto por métodos dependiente como independiente de cultivos, indicando que el tracto urinario porcino también está colonizado por una microbiota autóctona bastante homogénea, como lo indican los elevados índices de similaridad entre los patrones de DGGE descritos. Sin embargo no se debe subestimar la presencia de determinados géneros que integran la microbiota nativa, que se pueden seleccionar en determinadas situaciones como la preñez por IA y que pueden contener algunos microorganismos potencialmente patógenos como *Clostridium*.

Con el objetivo de conocer si la dinámica de colonización del TUG es diferente en cerdas con trastornos reproductivos, se tomaron muestras de hembras de diferentes establecimientos que presentarían DV, que estuvieran vacías con antecedentes de repeticiones de celo y una con mastitis agalactia.

A los fines de determinar cuáles cerdas se incluirían en el grupo E, además de los antecedentes reproductivos, se tuvo en cuenta la observación de: el área vulvar, la mucosa vaginal (vaginoscopia) y los preparados citológicos vaginales. En nuestro trabajo, solo en las cerdas con probable IU fue posible detectar la DV por observación del área vulvar, aunque

la exploración vaginoscópica dio normal. Oravainen y col. (2008) estudiaron cerdas con DV comparando la observación del área vulvar con la observación de la mucosa vaginal y con la citología vaginal sin encontrar asociación entre la vaginoscopia y los hallazgos citológicos, a diferencia de lo detectado en nuestros análisis.

Está descrito que los preparados citológicos de muestras con procesos inflamatorios suelen presentar, además de la gran cantidad de neutrófilos, material amorfo de fondo que puede corresponder a células degeneradas y fragmentadas (detritus) por acción de la reacción inflamatoria, así como fibrina y mucus (Fernández Algarra, 2010; de Oliveira Lima, 2012), hallazgos que de igual modo encontramos en los preparados de las cerdas del grupo E.

En cuanto a la dinámica de colonización de mesófilos y enterobacterias, la magnitud de colonización de V y U de cerdas enfermas fue similar a la observada en animales sanos (apartado 1.2). Asimismo, la colonización de enterobacterias parece responder al incremento de mesófilos, particularmente en U de cerdas E, donde esta interacción fue estadísticamente significativa. Por lo tanto es probable que el desarrollo de la enfermedad se asocie más a cambios en las características de las poblaciones presentes y no al incremento en la magnitud de la colonización microbiana. Similares observaciones se informaron en V de vaquillonas sanas comparadas con las que presentaron vaginitis, en ambas se informaron similares valores de colonización por microorganismos mesófilos (Gonzalez Moreno y col., 2016).

En el grupo E no se realizaron estudios independientes de cultivo, ya que el análisis de los perfiles de poblaciones bacterianas de acuerdo a la clínica de cada cerda E, escapa a los objetivos de este trabajo de tesis. Sin embargo fue posible realizar el aislamiento e identificación de los microorganismos para generar un stock de potenciales patógenos bacterianos porcinos autóctonos del TUG.

*Proteus mirabilis* se aisló de U de una cerda con DV por IU. Esta bacteria es un reconocido patógeno productor de IU asociadas a catéter en humanos (Jacobsen y col., 2008) y a su vez está descrito como una de las enterobacterias productoras de IU en cerdas, aunque siempre en menor porcentaje que *E. coli* (Gusmara y col., 2011; Piassa y col., 2015). *Staphylococcus aureus* se aisló de muestras de V y U de cerdas repetidoras de celo, así como de muestras de V de cerdas con DV. Este microorganismo está implicado en abscesos, artritis, enteritis, mastitis, metritis, septicemia neonatal y vaginitis en porcinos (Post, 2012; Kemper y col., 2013) mientras que *S. epidermidis*, aislado de U de una cerda con DV, es un patógeno oportunista que generalmente está involucrado en casos de bacteriemia y sepsis en pacientes inmunocomprometidos y recién nacidos prematuros (Marchant y col., 2013) y es un reconocido agente causal de mastitis en ovejas (Queiroga, 2018). *Enterococcus faecium* se aisló de V de una cerda repetidora de celo. Esta bacteria es







un patógeno oportunista que puede formar parte de la microbiota intestinal de humanos y animales (Lebreton y col., 2014). En este trabajo también se lo detectó como miembro de la microbiota de V de cerdas preñadas por IA (Capítulo 1, apartado 1.4.1) y ha sido reportado como agente etiológico de enteritis en lechones (Gottschalk, 2012) e IU en cerdas (Moreno y col., 2017), así como mastitis en vacas y cerdas (Kemper y col., 2013; Wu y col., 2016). *Streptococcus dysgalactiae* se aisló de U de cerdas con DV y repetidoras de celo. Esta bacteria es un patógeno oportunista que puede estar presente en la microbiota de la mucosa respiratoria, genital y mamaria del ganado porcino, donde además está reportada como agente etiológico de endometritis, artritis, endocarditis, meningitis, septicemia, mastitis e IU (Gottschalk, 2012; Lazarevic y col., 2012; Post, 2012; Kemper y col., 2013; Moreno y col., 2017).

*Bacillus pumilus* se aisló de V de cerdas con DV y con IU. Esta bacteria es un contaminante ambiental, aunque se ha informado como agente etiológico de infecciones cutáneas en humanos (con lesiones similares a las producidas por *B. anthracis*), sepsis neonatales, infección de catéter venoso central y artritis séptica infantil, incluso en pacientes inmunocompetentes (Bentur y col., 2007; Tena y col., 2007; Kimouli y col., 2012; Shivamurthy y col., 2016). Esta es la primera vez que se describe el aislamiento de esta bacteria en muestras clínicas en animales.

#### 1.4 Conclusiones parciales

Los resultados obtenidos en esta etapa permiten concluir que:

-  Diferencias en la estructura poblacional de la microbiota residente del TUG pueden adjudicarse a protocolos del manejo reproductivo, como por ejemplo el tipo de servicio utilizado para conseguir la preñez de las cerdas.
-  La magnitud de la población microbiana en V y U fue similar entre hembras sanas y enfermas en ambos nichos. Sin embargo, la U porcina presenta una microbiota característica que incluye, entre sus integrantes, a las enterobacterias.
-  La microbiota residente en U de cachorras y cerdas preñadas (SN e IA) parece ser menos variable que la de V en los mismos grupos de hembras.
-  La magnitud poblacional de la microbiota uretral parece no depender de la situación reproductiva, aunque la colonización por enterobacterias se ve favorecida por el estado de preñez.



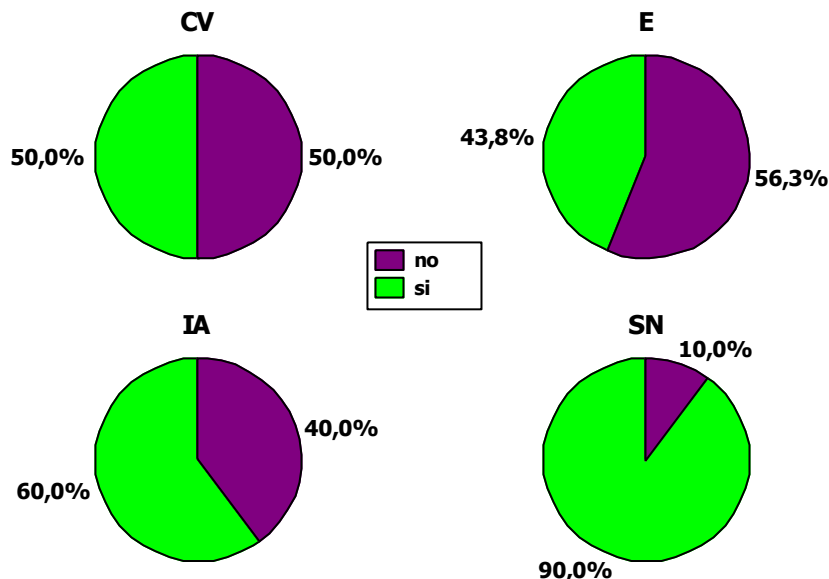
## CAPÍTULO 2

CARACTERIZACIÓN DE *Escherichia coli*  
NATIVAS DEL TRACTO UROGENITAL  
(TUG) PORCINO.

## 2.1 . Prevalencia de *Escherichia coli* en vagina (V) y uretra (U) de cachorras y cerdas preñadas sanas y cerdas vacías enfermas.

La prevalencia de *E. coli* en las muestras vaginales y uretrales de hembras porcinas de los diferentes grupos (CV, SN, IA y E) se determinó mediante el crecimiento obtenido en medio agar Mac Conkey (Materiales y Métodos, apartado II.3.1). Los microorganismos que resultaron lactosa (+), fermentadores de azúcares y formadores de ácido en TSI, H<sub>2</sub>S (-), productores de indol, citrato (-) y Voges-Proskauer (-), fueron confirmados como *E. coli* mediante la detección del gen que codifica para la enzima  $\beta$ -D-glucuronidasa (Materiales y Métodos, apartado III.1). Así, se obtuvieron 50 aislados de *E. coli* de hembras de las categorías: CV (n=8), SN (n=12), IA (n=12) y E (n=18). *Escherichia coli* se aisló del 50, 90, 60 y 44% de las muestras de CV, SN, IA y E, respectivamente (**Fig. 20**).

Al comparar la prevalencia de *E. coli* en U y V, se observó que fue significativamente mayor (Prueba exacta de Fisher, p=0,002) en las muestras de U (53,2%) con respecto a las de V (19,1%) (**Fig. 21**), tendencia que se mantuvo en todos los grupos de cerdas evaluados.



**Figura 20: Presencia de *E. coli* en muestras del TUG de: CV (cachorra virgen), SN (cerda preñada por servicio natural), IA (cerda preñada por inseminación artificial) y E (cerdas enfermas).**

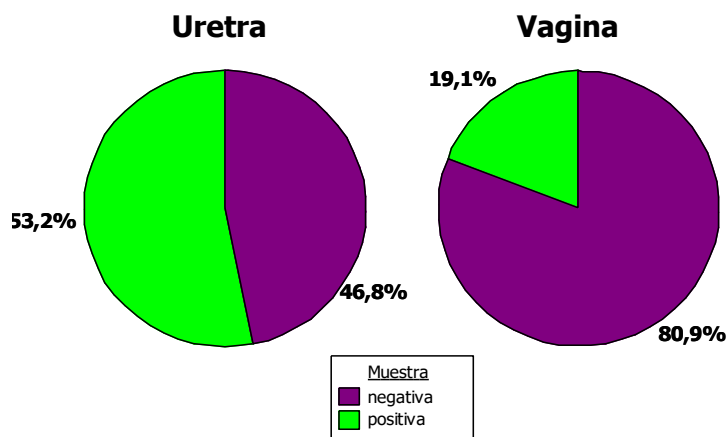


Figura 21: Distribución porcentual de muestras positivas para *E. coli* de ambos nichos evaluados.

## 2.2. Análisis clonal de los aislados de *Escherichia coli* del tracto urogenital (TUG) porcino y su relación con el perfil clínico del hospedador.

A fin de determinar la relación clonal de los aislados de *E. coli* se realizó un *fingerprinting* utilizando los cebadores simples ERIC2 (ERIC2-PCR) y BOX AR1 (BOX-PCR). El grado de similitud entre los aislados se determinó en base al coeficiente de correlación de Pearson y la agrupación en clústeres se realizó utilizando el método del coeficiente no ponderado de grupo de pares utilizando promedios aritméticos (UPGMA) (Materiales y Métodos, apartado III.2.1). Los *fingerprinting* generados por ERIC2-PCR contuvieron menos de 11 bandas (6 en promedio), con elevada similitud (>80%) entre todos los aislados. El análisis de los perfiles mostró la formación de 13 clústeres con una similitud interna entre 94 y 98% que se asociaron con las categorías de cerdas muestreadas (**Fig. 22**). En el caso de BOX-PCR, los *fingerprinting* tuvieron entre 4-12 bandas (8 en promedio). La similitud entre todos los aislados fue del 65%, es decir menor que con ERIC2-PCR. Del análisis de los perfiles se obtuvieron 2 clústeres mayores. En uno de ellos (con el 79% de similitud), se agruparon casi exclusivamente los perfiles de aislados de cerdas preñadas tanto SN como IA, mientras que en el otro clúster mayor (con un 80% de similitud), se agruparon la mayoría de los aislados de CV, todos los de cerdas E y los restantes de cerdas preñadas (**Fig. 23**). Cabe destacar que dentro de este último clúster la mayoría de los aislados de cerdas E se ubicaron en 2 grupos menores con 92 y 95% de similitud.

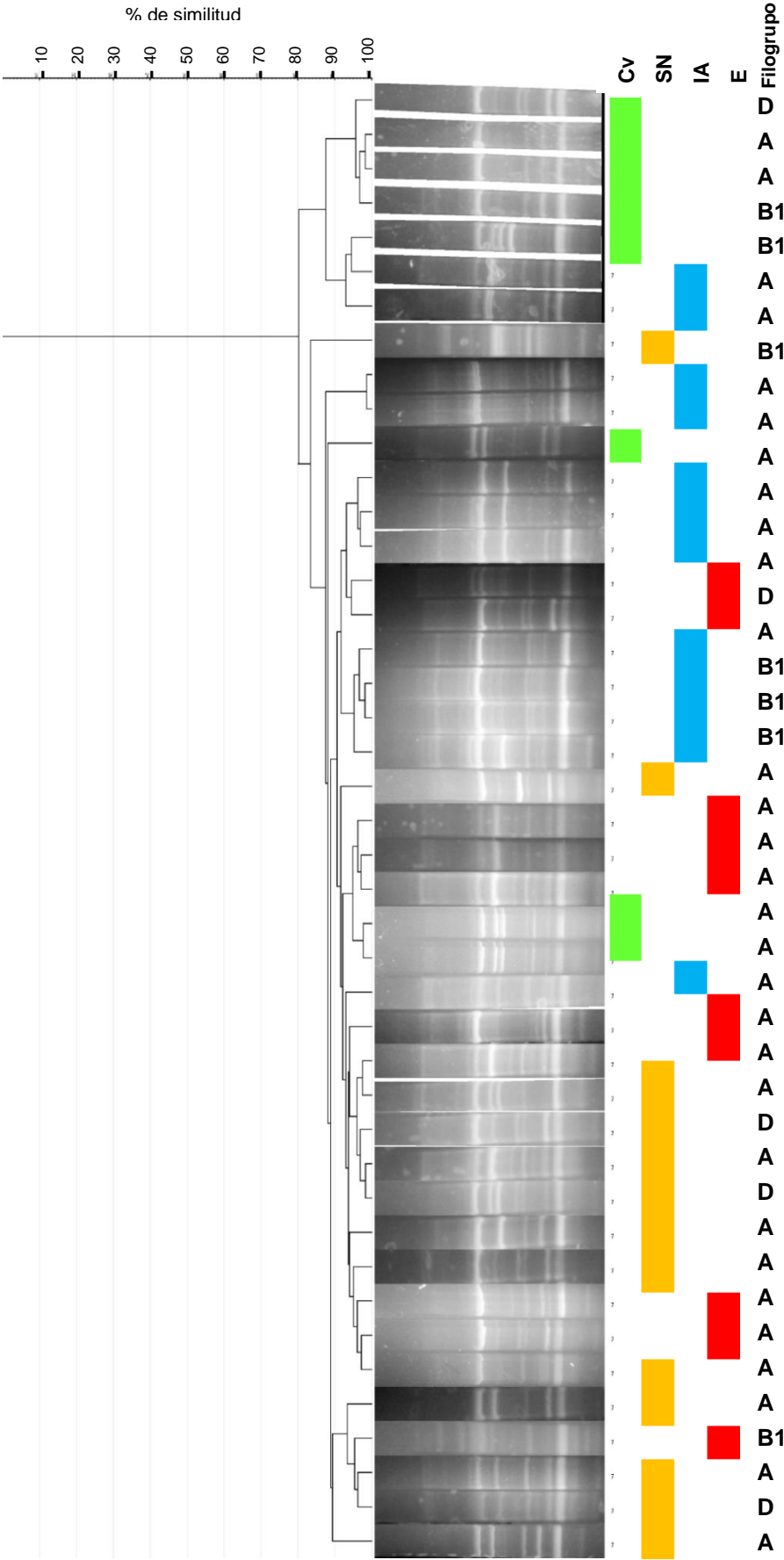


Figura 22 Análisis de clúster de los *fingerprints* obtenidos por ERIC2-PCR para las *E. coli* de los 4 grupos de cerdas. El dendrograma se generó por el método UPGMA utilizando el coeficiente de correlación de Pearson. El quinto casillero de la grilla indica el filogrupo determinado para cada aislado.

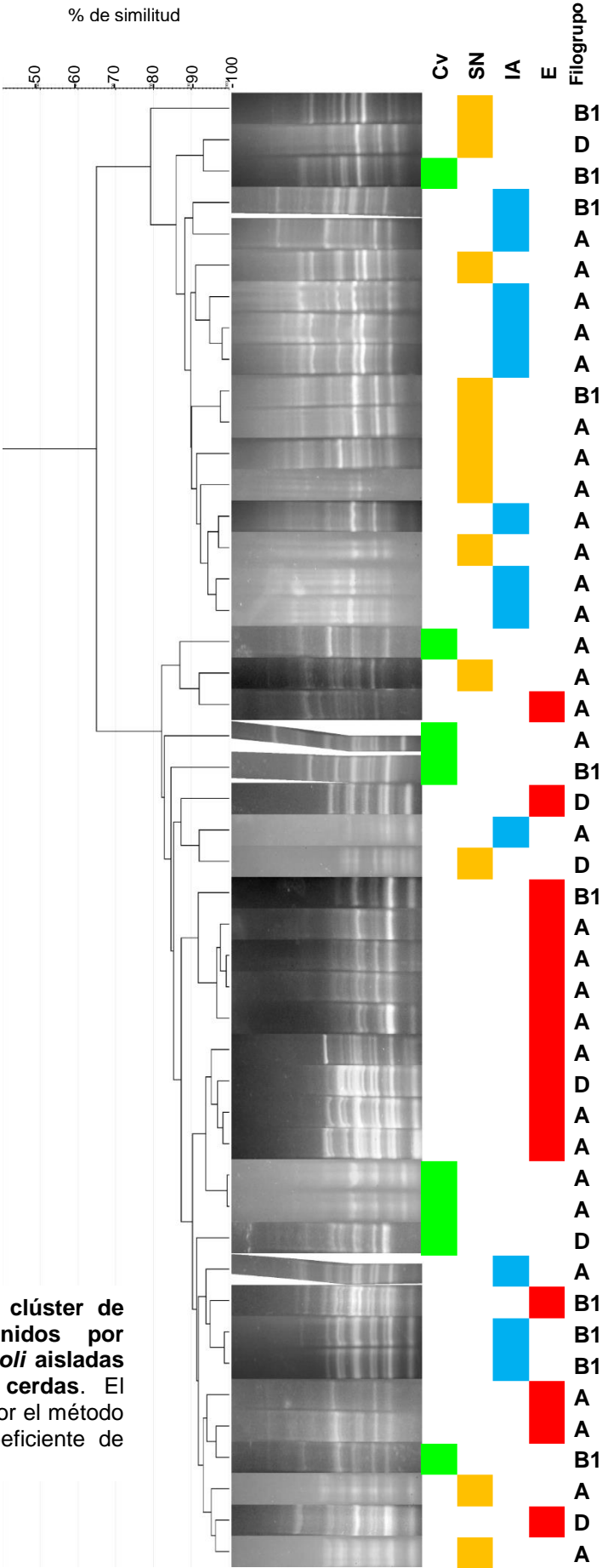


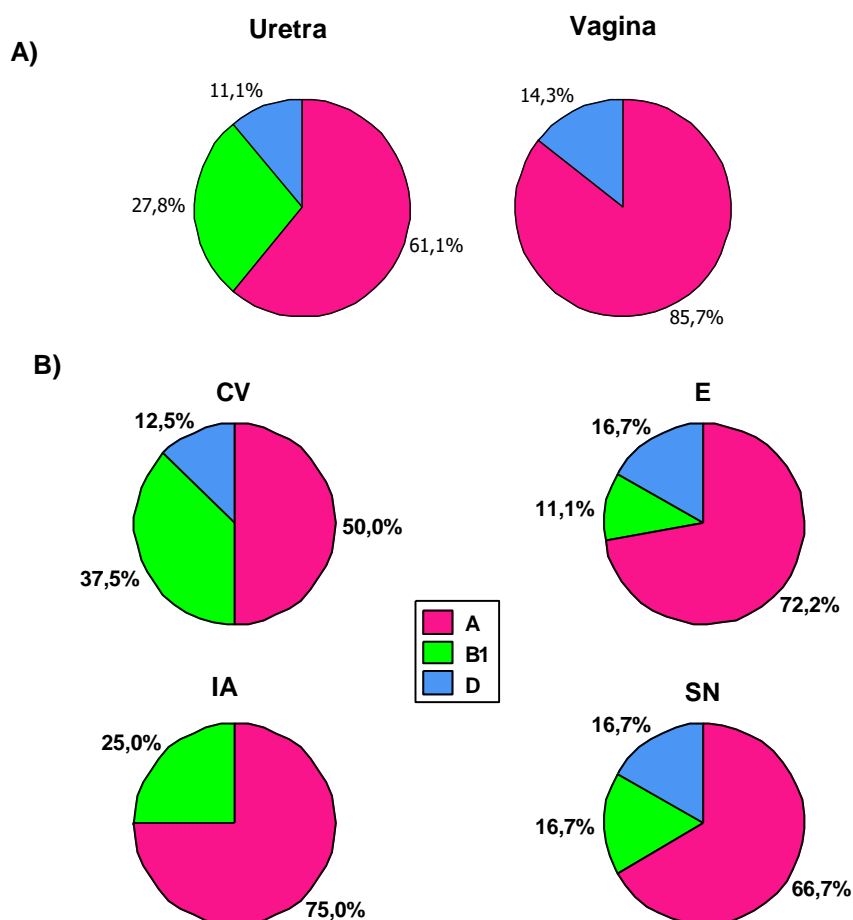
Figura 23: Análisis de clúster de los *fingerprints* obtenidos por BOX-PCR para las *E. coli* aisladas de los 4 grupos de cerdas. El dendograma se generó por el método UPGMA utilizando el coeficiente de correlación de Pearson.

### 2.3. Estructura filogenética de las poblaciones de *Escherichia coli* autóctonas de uretra (U) y vagina (V) porcina.

Mediante PCR multiplex (Materiales y Métodos, apartado III.2.2) se determinó el grupo filogenético de todos los aislados de *E. coli* (**Fig. 22 y 23**) según la clasificación de Clermont (A, B1, B2, o D). En ambos nichos (U y V), la mayoría de los aislados perteneció al filogrupo A (85,7% de V y el 61,1% de U); el filogrupo B1 solo se encontró en el 27,8% de las muestras de U (Prueba de Fisher  $p < 0,05$ ) y estuvo ausente en V, mientras que un bajo porcentaje de aislados (14,3% de V y 11,1% de U) fue caracterizado como filogrupo D. En ningún caso se detectaron aislados pertenecientes al filogrupo B2 (**Fig. 24 A**).

Al analizar la distribución de filogrupos de acuerdo a la categoría de cerda, se observó la presencia de los grupos A y B1 en las cuatro categorías de animales, mientras que el filogrupo D no se detectó entre los aislados de cerdas preñadas por IA (**Fig. 24 B**).

El filogrupo A está en mayor proporción en todas las categorías de hembras, detectándose los valores más elevados en cerdas E y preñadas por IA (72,2 y 75%, respectivamente) (**Fig. 24 B**).



**Figura 24: Distribución de los filogrupos de *E. coli*. A)** en los nichos estudiados. **B)** en las categorías de animales. **CV** (cachorra virgen), **SN** (cerda preñada por servicio natural), **IA** (cerda preñada por inseminación artificial) y **E** (cerdas enfermas).



#### 2.4. Perfil de resistencia a los antimicrobianos (RAM) de *Escherichia coli* autóctonas del tracto urogenital (TUG) porcino.

A través de la evaluación del comportamiento de las *E. coli* frente a diferentes antimicrobianos mediante la técnica de difusión de discos en agar MH (Materiales y Métodos, apartado III. 2.3), se observó que el 46% de los aislados presentó resistencia por lo menos a uno de los antibióticos ensayados (**Fig. 25**). No se encontraron diferencias significativas (Prueba exacta de Fisher  $p > 0,05$ ) en la distribución de la resistencia para cada antibiótico entre los aislados de U y V.

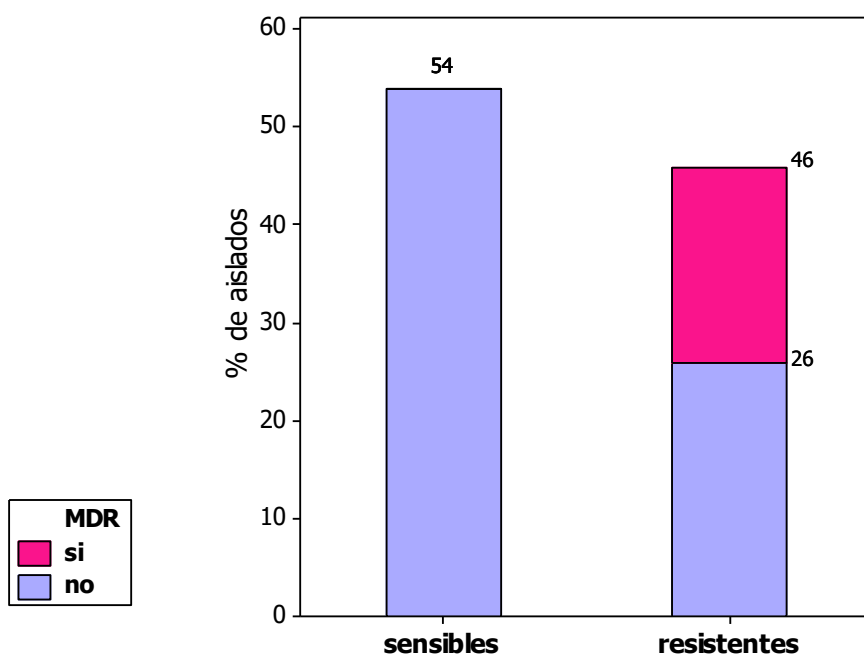
Asimismo, se determinó la presencia de aislados multirresistentes (**MDR**) definidos como aquellos microorganismos que presentaron resistencia frente, al menos, tres clases diferentes de antibióticos. Así el 20% de los aislados evaluados resultó MDR (**Fig. 25**), y estuvieron en igual proporción en CV, IA y E por lo que no se asociaron en particular a ningún grupo de hembras (Prueba exacta de Fisher  $p > 0,05$ ); ninguno de estos aislados perteneció al grupo de cerdas SN.

La sensibilidad a las cefalosporinas ensayadas (**CTX** y **CAZ**) fue del 100% en el grupo de *E. coli* estudiadas. Por otra parte, la mayor resistencia detectada fue frente a **TE** (38%) y **AMP** (30%), mientras que para **S**, **AMC**, **CIP** y **TMS** no superó el 12% (12, 10, 6 y 6%, respectivamente) (**Fig. 26**).

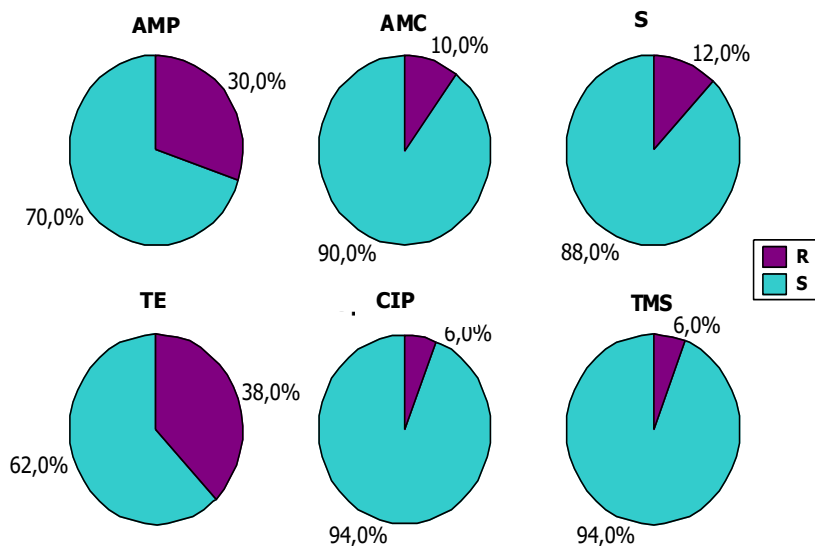
Al analizar la distribución de resistencia entre los grupos de cerdas estudiados, se encontró que solo la resistencia a **TE** estuvo presente en los cuatro grupos de hembras, siendo mayor entre los aislados de CV (62,5%) y E (50%). Sin embargo en los aislados de cerdas SN solo se detectó resistencia a este antibiótico, siendo sensibles al resto de los antimicrobianos ensayados (**Fig. 27**). La resistencia a **AMP** y **AMC** se detectó en los otros 3 grupos de hembras (CV, IA y E).

Con respecto a **AMP**, los aislados de IA y E mostraron porcentajes de resistencia altos y similares: 42 y 44%, respectivamente. Sin embargo el porcentaje de aislados resistentes a **AMC** fue mayor en el grupo E (17%). La resistencia a **S** solo se detectó en los grupos IA y E (33 y 11%, respectivamente) mientras que la resistencia a **TMS** solo se encontró en porcentajes similares en los grupos CV y E (12,5 y 11%, respectivamente).

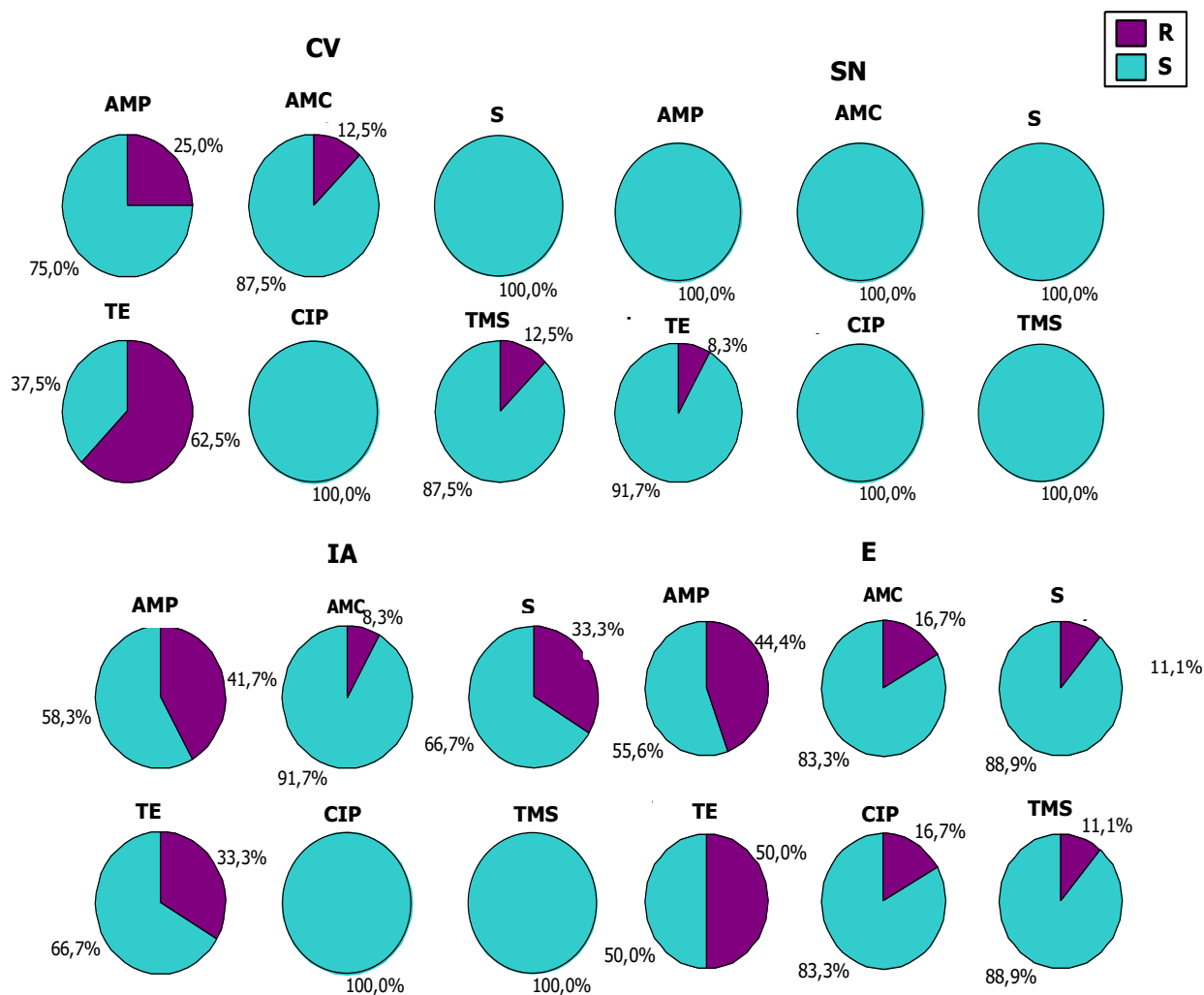
Cabe destacar que en el grupo E se encontró resistencia a todos los antimicrobianos ensayados, salvo para las cefalosporinas y que en ningún aislado de *E. coli* se detectó producción de Beta lactamasas de espectro extendido (BLEE).



**Figura 25: Resistencia a antimicrobianos en *E. coli* nativas del TUG porcino.** Los resultados se expresan como porcentaje sobre el total de aislados evaluados. **MDR:** aislados multiresistentes.



**Figura 26: Distribución de la resistencia a antimicrobianos de las *E. coli* aisladas de TUG de cerdas.** en el total de aislados **AMP:** ampicilina, **AMC:** amoxicilina/ ác. clavulánico, **S:** estreptomicina, **TE:** tetraciclina, **CIP:** ciprofloxacina, **TMS:** Trimetoprima/sulfametoxazol.



**Figura 27: Distribución de la resistencia a antimicrobianos de las *E. coli* del TUG de: CV (cachorra virgen, IA (cerda preñada por inseminación artificial), E (cerda enferma) y SN (cerda preñada por servicio natural). AMP: ampicilina, AMC: amoxicilina/ác. clavulánico, S: estreptomicina, TE: tetraciclina, CIP: ciprofloxacina, TMS: Trimetoprima/sulfametoxazol.**

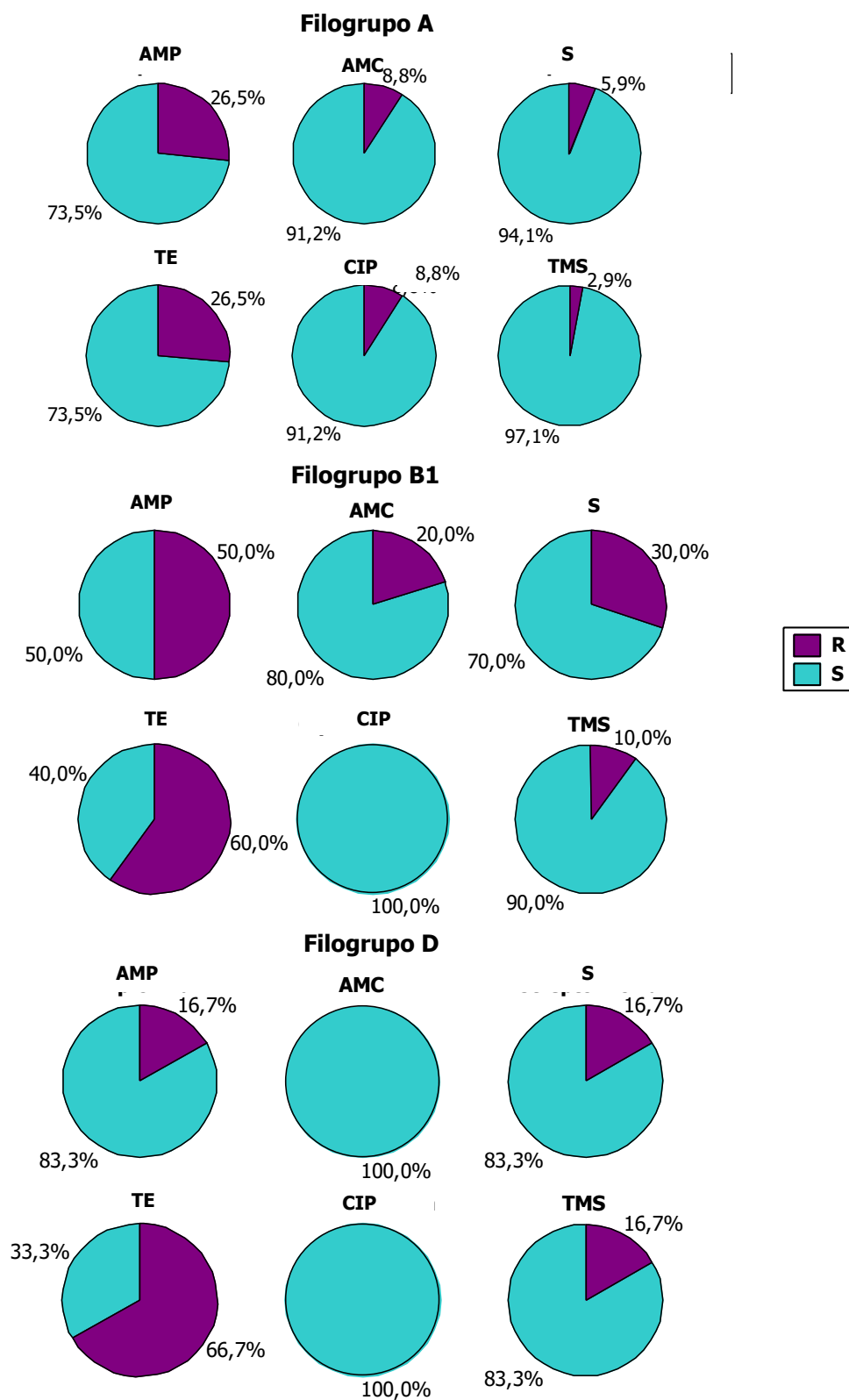
## 2.5. Resistencia a antimicrobianos (RAM) en los diferentes filogrupos que conforman las poblaciones nativas del tracto urogenital (TUG) porcino.

Al analizar la prevalencia de resistencia en relación a los filogrupos detectados en las *E. coli* porcinas (A, B1 y D), se observó algún porcentaje de aislados resistentes a **AMP**, **S**, **T** y **TMS** en los tres filogrupos (**Fig. 28**). Sin embargo, al aplicar el análisis de correspondencias se detectó asociación significativa (contribución a Chi cuadrado acumulado: 64,32%) entre el filogrupo B1 y la resistencia a **AMP** y **S**.

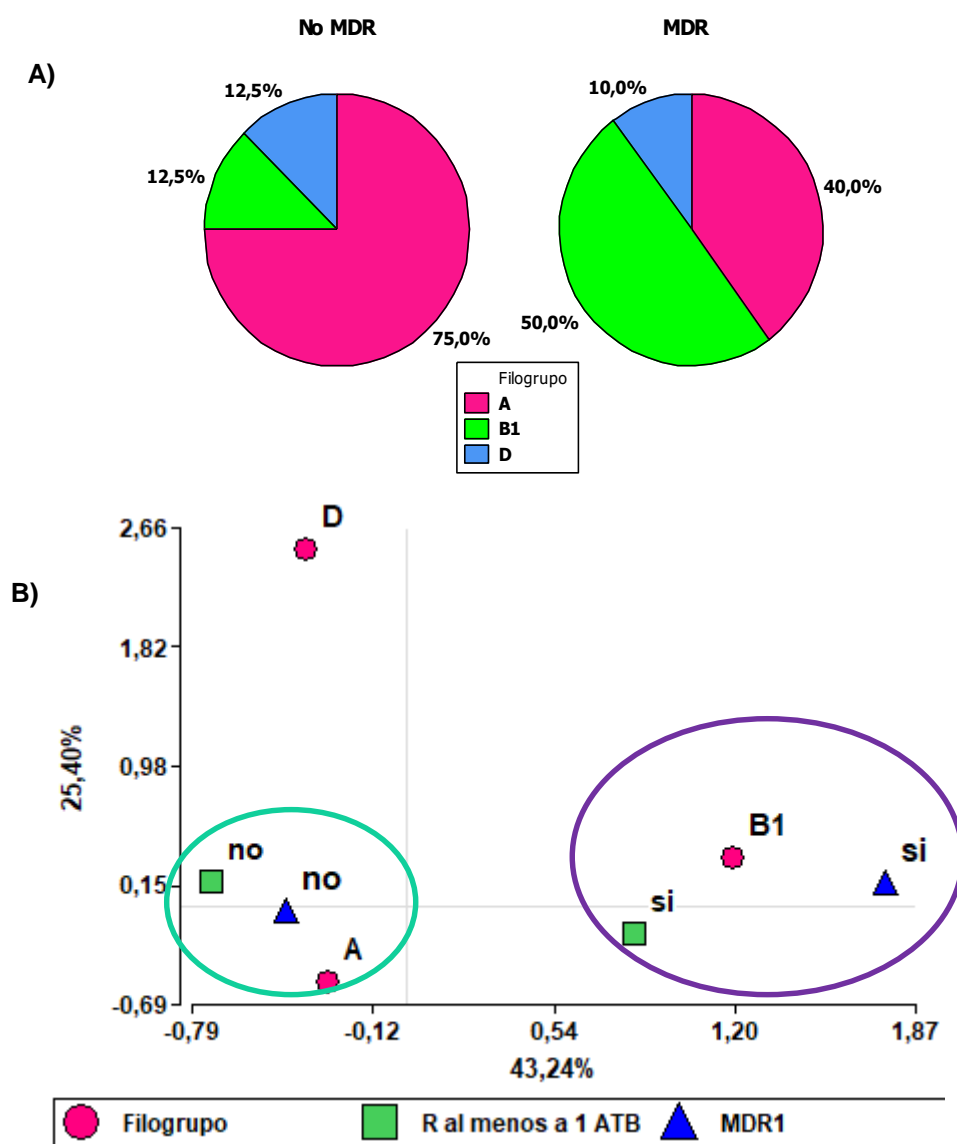
La resistencia a **AMC** se detectó en los filogrupos A y B1 (8,8 y 20%, respectivamente) pero no en D; sin embargo no se observaron diferencias significativas entre ellos (Prueba exacta de Fisher,  $p < 0,05$ ). Solamente en el filogrupo A se detectó alguna resistencia a **CIP** (**Fig. 28**).

En la población de las *E.coli* **No MDR**, el filogrupo A (75%) fue significativamente más prevalente (Prueba exacta de Fisher,  $p = 0,001$ ); sin embargo en la población de los aislados **MDR** el filogrupo más prevalente fue B1 (50%), seguido por A (40%) (**Fig. 29 A**). El filogrupo D estuvo presente en ambas poblaciones en porcentajes similares (12,5 y 10%, respectivamente).

Un análisis de correspondencia entre los filogrupos y la ocurrencia de resistencia antimicrobiana arrojó asociación significativa entre B1 con cualquier resistencia y también con **MDR**; además, se observó que hubo asociación entre el filogrupo A y los aislados **No MDR** y con los sensibles a todos los antibióticos (Prueba exacta de Fisher,  $p < 0,05$ ) mientras que el filogrupo D no se asocia a ninguna condición (**Fig. 29 B**).



**Figura 28: Distribución de la resistencia antibiótica de *E. coli* frente a cada antimicrobiano y grupo filogenético.** AMP: ampicilina, AMC: amoxicilina/ác. clavulánico, S: estreptomina, TE: tetraciclina, CIP: ciprofloxacina, TMS: Trimetoprima/sulfametoxazol



**Figura 29: Relación entre tipo de resistencia y filogrupos** **A)** Distribución de los filogrupos de *E. coli* de acuerdo al perfil **MDR** (multirresistencia). **B)** Análisis de correspondencia entre el filogrupo y el tipo de resistencia. Los aislados **MDR** se asociaron a los filogrupos B1 y D mientras que los **No MDR** se asociaron al filogrupo A (test exacto de Fisher  $p < 0,05$ ).

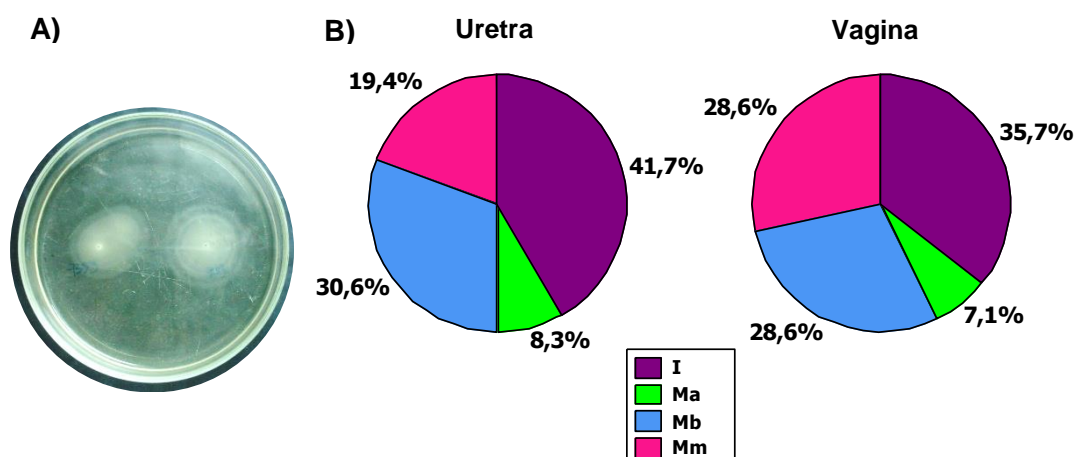
## 2.6. Evaluación de determinantes de patogenicidad de *Escherichia coli* autóctonas del tracto urogenital (TUG) porcino.

### 2.6.1 Factores asociados a adhesión y colonización

#### a) Movilidad

La capacidad de una bacteria de movilizarse es un factor que debe tenerse en cuenta cuando se desea evaluar su capacidad para la colonización, especialmente en el TUG. Las *E. coli* porcinas se clasificaron de acuerdo al diámetro de migración (Materiales y Métodos III.3.1, Tabla 2) obtenido luego de su crecimiento en placas de LB agar 0,3% (**Fig. 30 A**). Los resultados indicaron que el 65% de los aislados presentó algún tipo de movilidad (10,5% Ma, 21% Mm, 33,5% Mb). La distribución en las poblaciones aisladas de las cuatro categorías fue similar al comparar U y V (**Fig. 30 B**).

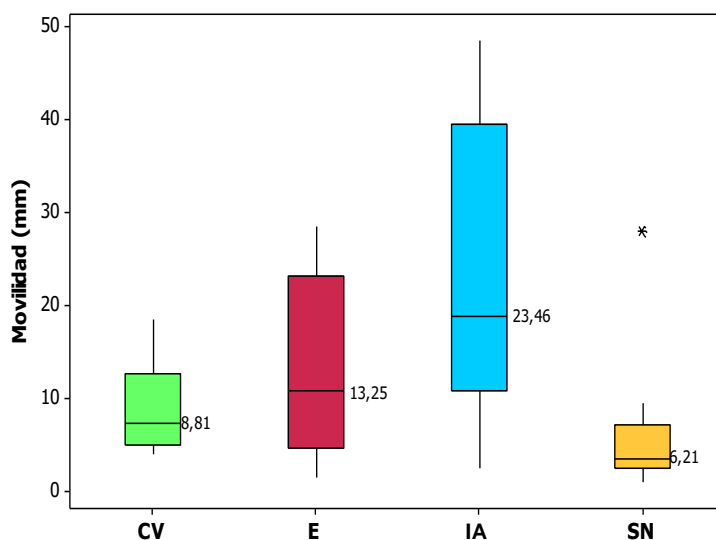
Cuando se realizó un análisis comparativo de la movilidad de los aislados provenientes de las cuatro categorías de cerdas (CV, SN, IA y E), se observó que las *E. coli* del grupo de IA fueron significativamente más móviles ( $p=0,002$ , Prueba LSD Fisher) que las aisladas de los otros grupos (**Fig. 31**). También se observó una tendencia entre los aislados de E a presentar mayor movilidad que los de CV y SN; sin embargo no fue posible determinar la significancia de esta diferencia (**Fig. 31**).



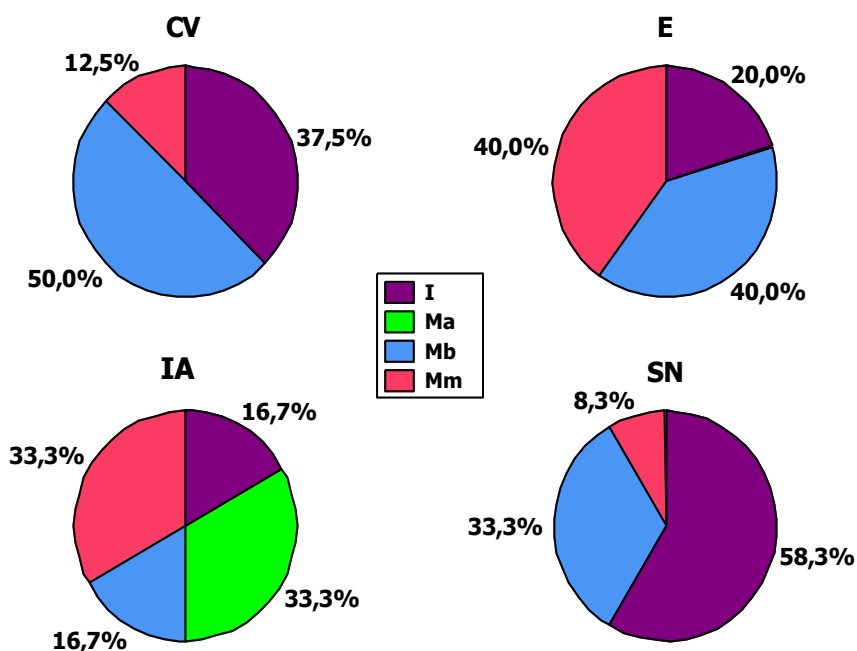
**Figura 30:** A) Movilidad de *E. coli* en agar LB al 0,3%. Se muestran dos aislados de movilidad media (Mm) B) Distribución de las *E. coli* según su movilidad y nicho de origen. Ma; Movilidad alta, Mm: movilidad media, Mb: movilidad baja, I: inmóviles.

La distribución de la propiedad de movilidad en las poblaciones proveniente de cada categoría animal muestra que los aislados con movilidad alta (Ma) estuvieron presentes solo en el grupo de las cerdas preñadas por IA y se clasificaron dentro del filogrupo A. Asimismo, se observó que los aislados con movilidad media (Mm) fueron más prevalentes en el grupo de cerdas E (40%). En contraposición, los mayores porcentajes de movilidad baja más los

inmóviles (**Mb+I**), se detectaron entre los aislados de CV y cerdas preñadas por SN (87,5 y 91,3%, respectivamente) (**Fig. 31**).



**Figura 31: Movilidad de las *E. coli* aisladas de diferentes grupos de cerdas CV (cachorra virgen), SN (cerda preñada por servicio natural), IA (cerda preñada por inseminación artificial) y E (cerdas enfermas).**

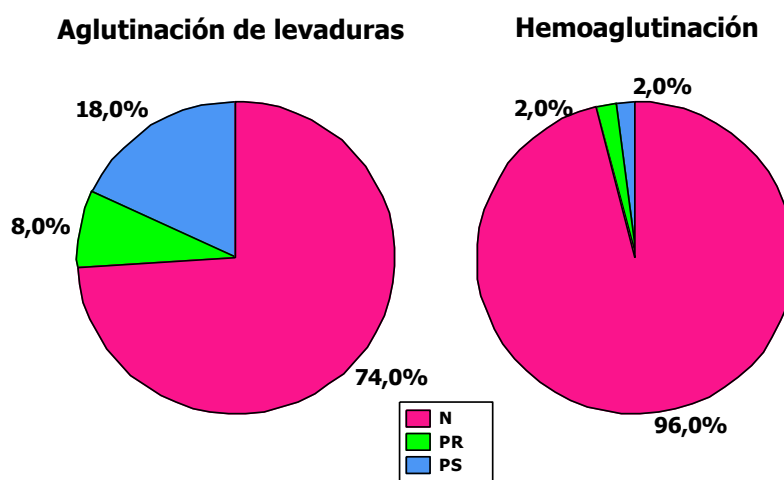


**Figura 32: Grados de movilidad de las *E. coli* aisladas de: CV (cachorra virgen), SN (cerda preñada por servicio natural), IA (cerda preñada por inseminación artificial) y E (cerdas enfermas).**



**b) Expresión de fimbria P y pili tipo I. Presencia de adhesinas asociadas a ECPEX**

La expresión del pili tipo 1 se ensayó evaluando la capacidad de los aislados de *E. coli* para aglutinar células de *Sacharomyces cerevisiae*, mientras que la expresión de la fimbria P se evaluó mediante la aglutinación de GR humanos del grupo A (Materiales y Métodos, apartado III.3.2). Los resultados obtenidos indican un bajo porcentaje de expresión del pili tipo 1 (aglutinación de levaduras sensible a manosa) y fimbria P (aglutinación de GR resistente a manosa) en las condiciones ensayadas (18 y 2%, respectivamente) (**Fig. 33**).

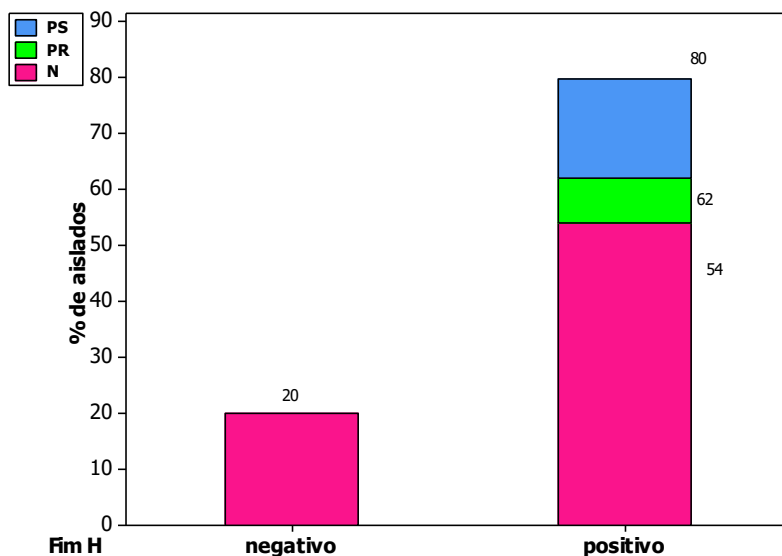


**Figura 33: Porcentaje de aislados para aglutinación de levaduras y hemoagglutinación.** N: negativo, PR positivo resistente a manosa, PS positivo sensible a manosa.

Mediante PCR se evaluó la presencia del gen *fimH* (adhesina del pili tipo 1) y de los genes *papC* y *papAH* (pertenecientes al operón que codifica para la fimbria P); también se estudiaron otras fimbrias y adhesinas no fimbriales asociadas a ECPEX (Materiales y Métodos, apartado III.3.5) tales como fimbria S, fimbria F1C y la familia de adhesinas no fimbriales Dr. Los resultados mostraron reacciones negativas para *papC* (proteína de ensamblaje de la fimbria P), *sfa/focDE* (región consenso del operón de las fimbrias F1C y S), para los genes *afa/adra BC* (región consenso de la familia de adhesinas no fimbriales Dr). Sin embargo el 80% de los aislados fue positivo para el gen *fimH* (adhesina del pili tipo 1), a pesar que solo el 18% de los aislados fue capaz de expresar el pili tipo 1 funcional en las condiciones ensayadas (**Fig. 34**), y un elevado porcentaje de los aislados positivos para el gen fueron incapaces de aglutinar las levaduras (54%), o presentaron aglutinación resistente al tratamiento con manosa (8%). Como era de esperar, todos los *E. coli* negativos (20%) en la detección del gen *fimH* también presentaron reacción de aglutinación negativa (**Fig. 34**).

Solamente en el aislado LEMSA 7736 se detectó el gen *papAH*, sin embargo no fue capaz de aglutinar los GR.

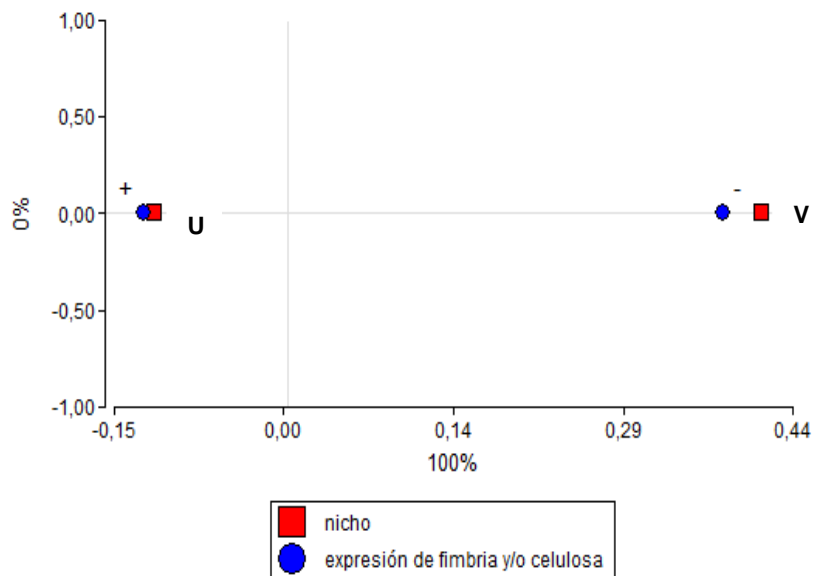
Los aislados que expresaron el pili tipo 1 (PS) no tuvieron una distribución especial respecto del origen en cuanto al nicho (U y V) o la categoría de los animales (CV, SN, IA, E). Los que aglutinaron levaduras y fueron resistentes a manosa provenían de cerdas preñadas por IA.



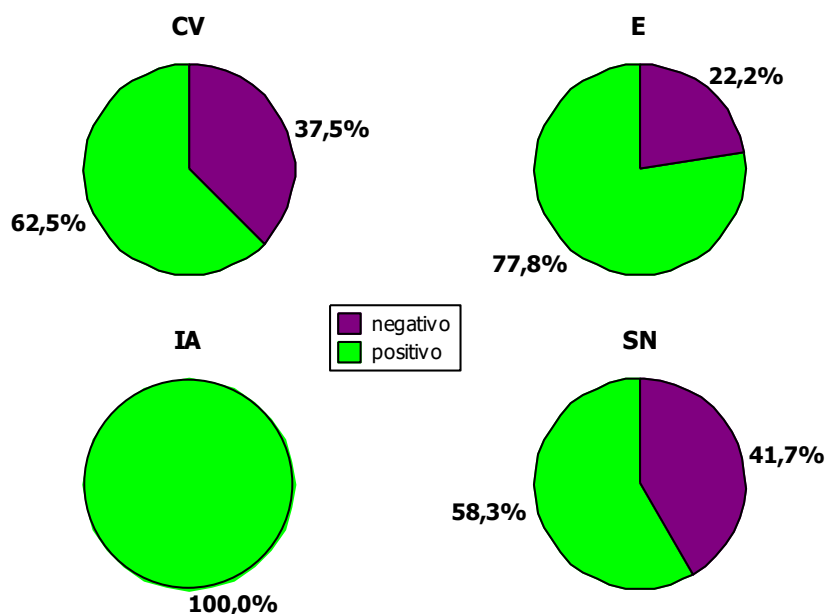
**Figura 34: Relación entre la presencia del gen *fimH* y la aglutinación de levaduras.** N: aglutinación negativa, PR positivo resistente a manosa, PS positivo sensible a manosa.

### c) Expresión de fimbria curli y celulosa

El 76% de los aislados fue capaz de expresar fimbria curli y/o celulosa (RC+) en el medio (RC) adicionado con colorante Rojo Congo (Materiales y Métodos, apartado III.3.3); el análisis de correspondencia asoció los morfotipos RC+ con el nicho uretral (**Fig. 35**). Más del 58% de los aislados de los cuatro grupos de animales fue RC+, alcanzando el 100 y 77,8% en los grupos de IA y E, respectivamente. Solo se encontró asociación positiva entre RC+ y el grupo IA (Prueba exacta de Fisher  $p < 0,05$ ) (**Fig. 36**).



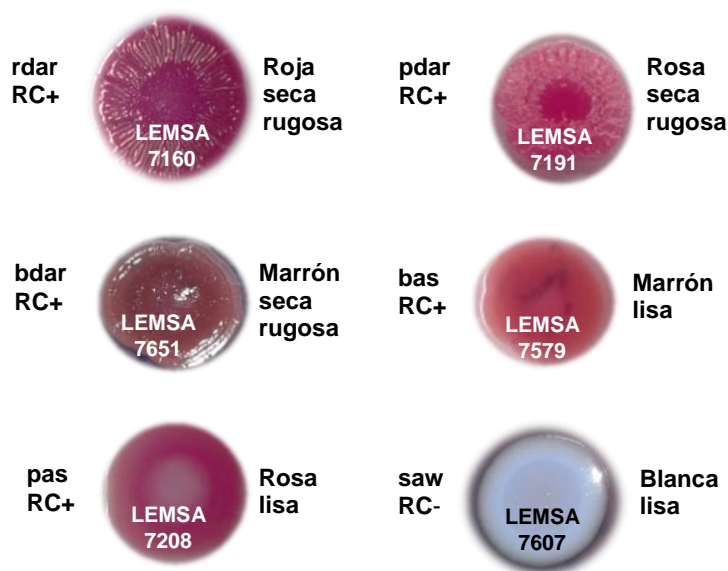
**Figura 35: Análisis de correspondencia: nicho vs expresión de fimbria curli y/o celulosa por las *E. coli* del TUG porcino.**  
Cambiar en la gráfica ur por U y v por V



**Figura 36: Distribución de las *E. coli* RC+ en: CV (cachorra virgen), SN (cerda preñada por servicio natural), IA (cerda preñada por inseminación artificial) y E (cerdas enfermas).**

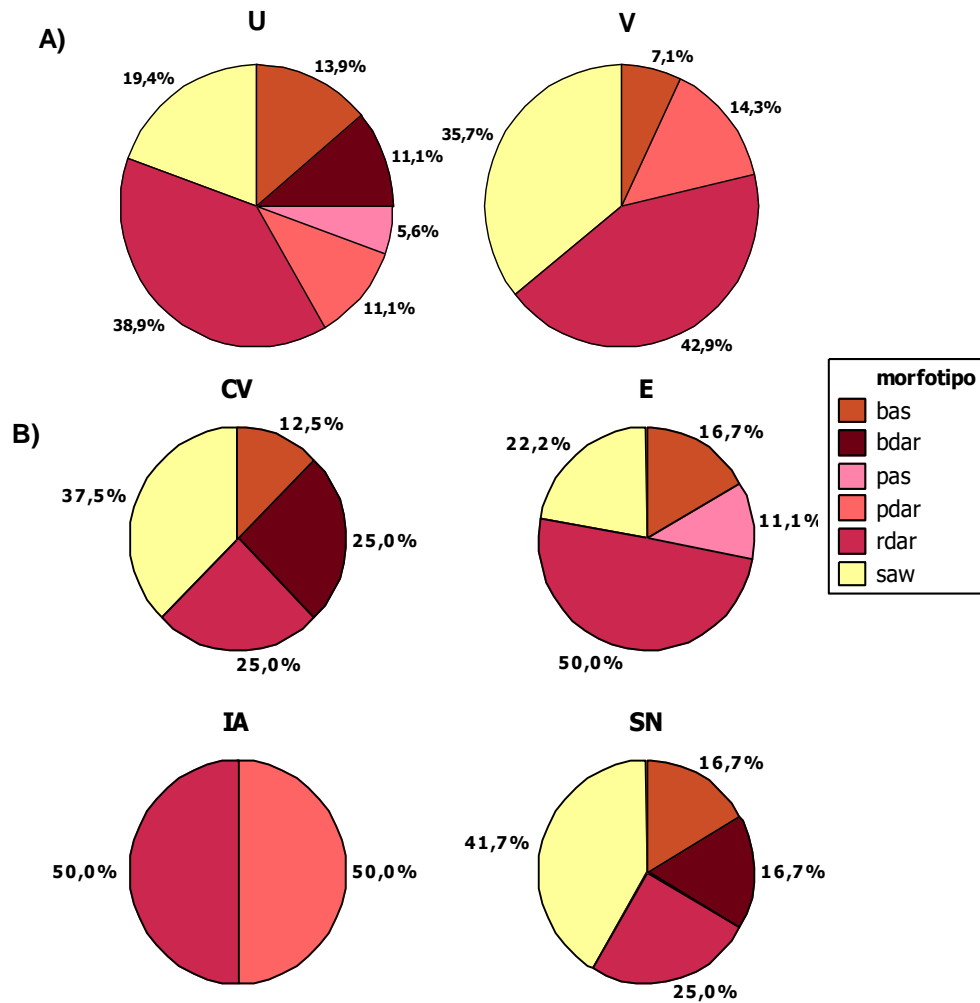
De acuerdo al color y a la rugosidad, las colonias las *E. coli* porcinas que desarrollaron en el medio RC mencionado, se clasificaron en los morfotipos: **rdar**, **pdar**, **bdar**, **bas**, **pas** (todos ellos RC+) y **saw** (RC-) (Materiales y Métodos, apartado III.3.3) (**Fig. 37**). En cuanto a la distribución de los mismos se encontró similar proporción del morfotipo rdar en U y V (39 y 43%, respectivamente), así como del morfotipo pdar (11 y 14%, respectivamente). Aunque

se observó mayor proporción de los morfotipos pas y saw en los aislados de V, no se pudo establecer que dicha diferencia fuera estadísticamente significativa (Prueba exacta de Fisher,  $p > 0,05$ ). Los morfotipos bdar y pas solo se observaron en el grupo de aislados uretrales. Si bien el morfotipo rdar se encontró en *E. coli* de los 4 grupos de animales, su presencia fue mayor en el grupo IA (50%) y E (50%) que en CV y preñadas SN (25% en ambos) (**Fig. 38**).

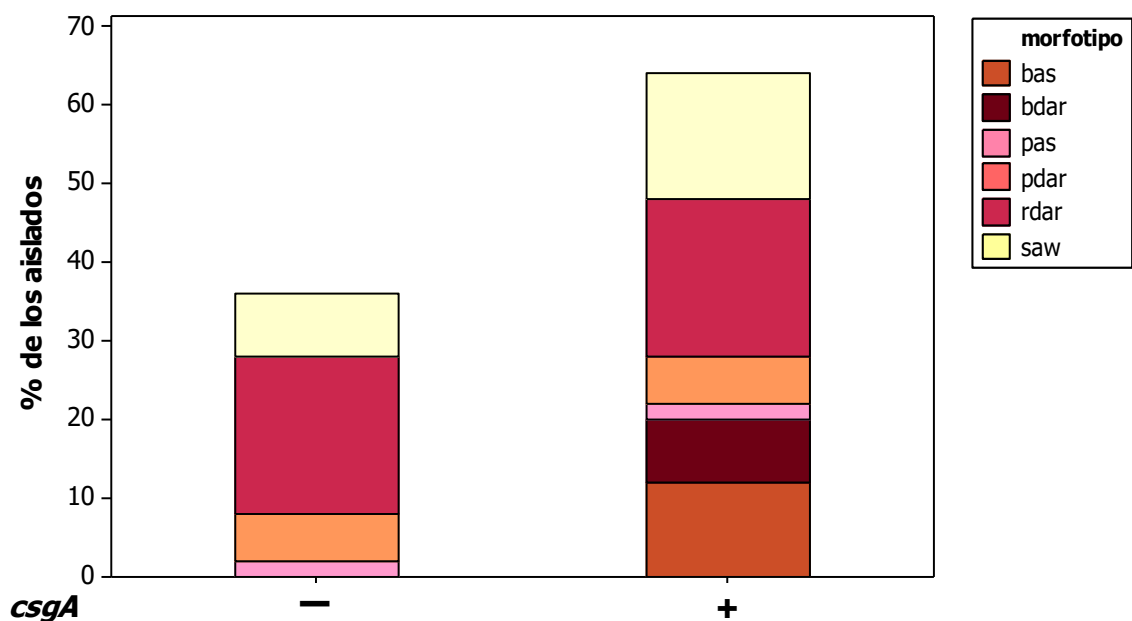


**Figura 37. Morfotipos de colonias de *E. coli* del TUG porcino obtenidos en LB agar adicionado con Rojo Congo y sin NaCl. Se indica cuando se consideraron productoras de fimbria curli/celulosa (RC+) o no productoras (RC-).**

Se evaluó la presencia del gen *csgA* (Materiales y Métodos, apartado III.3.5) que codifica para la subunidad A de la fimbria curli, se comparó la presencia del mismo con la capacidad de ligar RC y con la morfología obtenida en el medio adicionado con el colorante. La reacción de PCR para detectar el gen *csgA* arrojó resultados positivos en el 64% de los aislados, de los cuales el 48% fue RC+. Asimismo en el 36% de aislados *csgA*<sup>-</sup>, el 28% fue RC+. Cabe destacar que el morfotipo rdar fue expresado tanto por aislados *csgA*<sup>+</sup> (20%) como por *csgA*<sup>-</sup> (20%) (**Fig. 39**).



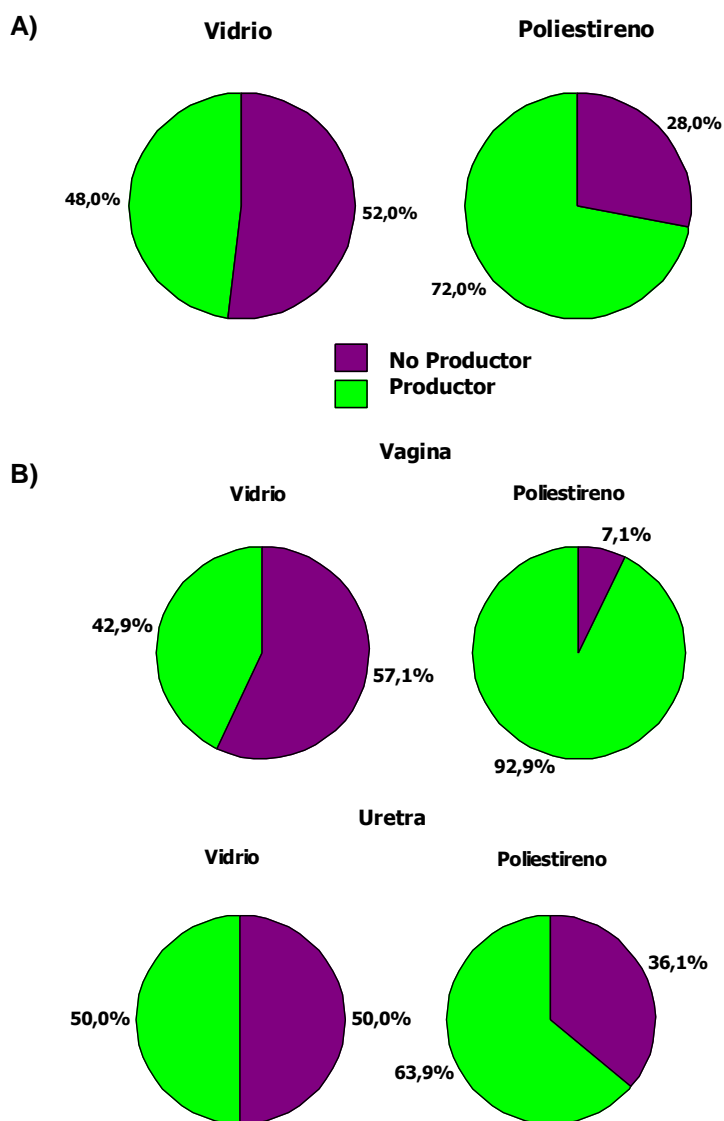
**Figura 38:** Distribución de morfotipos obtenidos en RC. **A)** en ambos nichos. **B)** en las categorías: **CV** (cachorra virgen), **SN** (cerda preñada por servicio natural), **IA** (cerda preñada por inseminación artificial) y **E** (cerdas enfermas).



**Figura 39:** Morfotipos expresados en medio RC por las *E. coli* *csgA*<sup>+</sup> y *csgA*<sup>-</sup>. En el eje Y se indica el % de aislados.

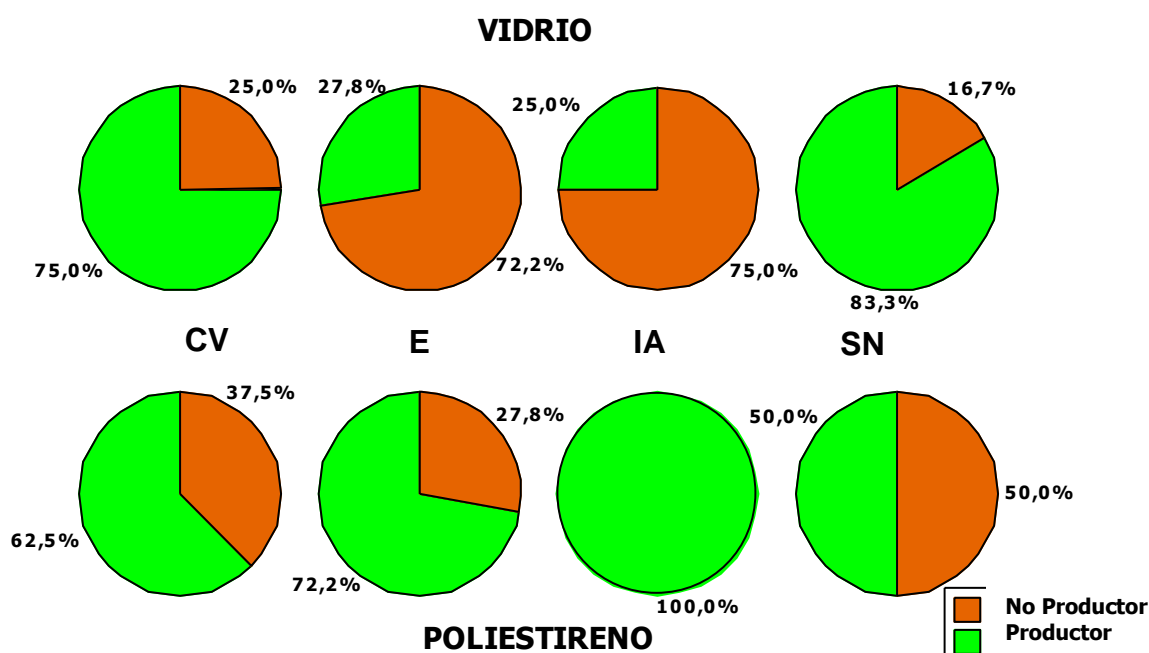
**d) Formación de biofilm**

Se evaluó la capacidad de *E. coli* de formar biofilm sobre dos tipos de superficies: vidrio y poliestireno (Materiales y Métodos, apartado III.3.4). El 48 y el 72% de los aislados fue capaz de producir biofilm sobre vidrio y poliestireno, respectivamente (**Fig. 40 A**); sin embargo, en general, la mayoría fueron débiles productores, excepto *E. coli* LEMSA 7190 aislada de cerda preñada por IA y LEMSA 7744 aislada de una cerda del grupo E, que se clasificaron como moderadas productoras de biofilm sobre poliestireno. Al considerar los nichos de los cuales se aislaron las *E. coli*, se encontró que el 42,9 y el 92,9% de los aislados de V y el 50 y 63,9% de los aislados de U produjeron biofilm sobre vidrio y poliestireno, respectivamente (**Fig. 40 B**).



**Figura 40: *E. coli* productoras de biofilm A)** el total de aislados, sobre vidrio y poliestireno **B)** Distribución de la producción de acuerdo al nicho del cual se realizaron los aislamientos.

Al considerar las categorías de cerdas, se detectó que el 100% de los aislados de IA y el 72,2 de cerdas E formaron biofilm sobre poliestireno, habiendo una asociación positiva y significativa entre IA y formación de biofilm sobre poliestireno (Prueba exacta de Fisher,  $p < 0,05$ ), mientras que sobre vidrio los aislados de estas dos categorías de cerdas no superaron el 25 y 27,8%, respectivamente. En el caso de los aislados de CV y SN el 50% o más fueron capaces de formar biofilm en los dos soportes ensayados (Fig. 41).

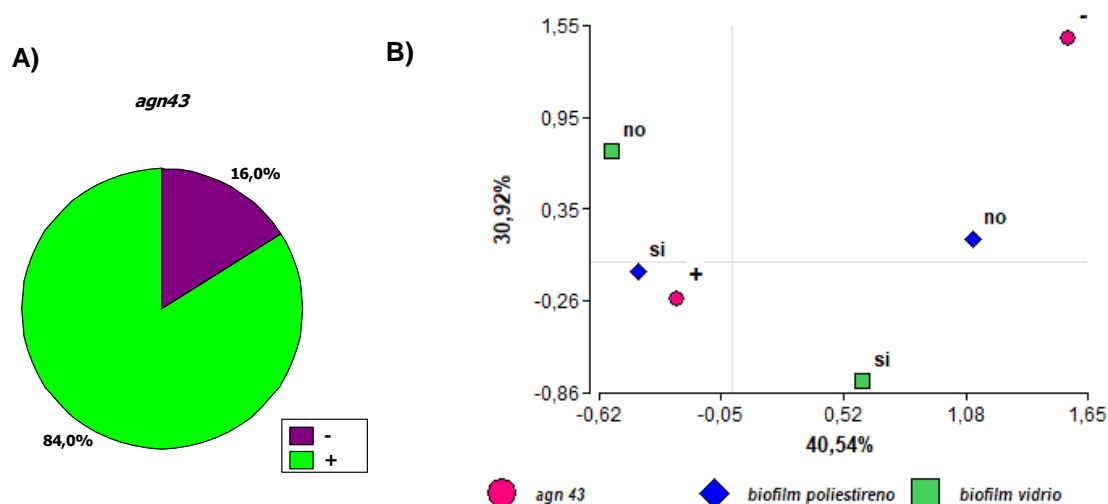


**Figura 41:** *E. coli* productoras de biofilm sobre vidrio y poliestireno aisladas de CV (cachorra virgen), SN (cerda preñada por servicio natural), IA (cerda preñada por inseminación artificial) y E (cerdas enfermas).

Se observó formación de biofilm incluso en aislados de *E. coli* que no expresaron fimbria curli y/o celulosa (RC-). De hecho en nuestro estudio la formación de biofilm sobre vidrio estuvo mayormente asociada a aquellos aislados de morfología saw, es decir RC- (Prueba exacta de Fisher,  $p = 0,02$ ). Esto muestra que los fenotipos RC+ no son esenciales para la formación de biopelículas. Sin embargo se observó una asociación significativa entre la formación de biofilm sobre poliestireno y la expresión del morfotipo rdar (Prueba Exacta de Fisher,  $p = 0,03$ ).

La autoagregación bacteriana es una propiedad fuertemente asociada a la formación de biofilm y el antígeno 43 es un autotransportador que media la autoagregación de *E. coli* y está implicado en las primeras etapas de la formación del biofilm. Las *E. coli* porcinas fueron evaluadas mediante PCR para detectar la presencia del gen que lo codifica, utilizando un cebador universal (Materiales y Métodos, apartado III.3.5). La reacción dio positiva en el 84% de los aislados y al analizar por grupo de animal se detectó en más del 87% de las *E.*

*coli* de todos los grupos, llegando al 100% en los grupos IA y E. Además, mediante el análisis de correspondencias, se detectó asociación positiva entre la presencia de este antígeno y la formación de biofilm sobre poliestireno (Fig. 42 A y B).

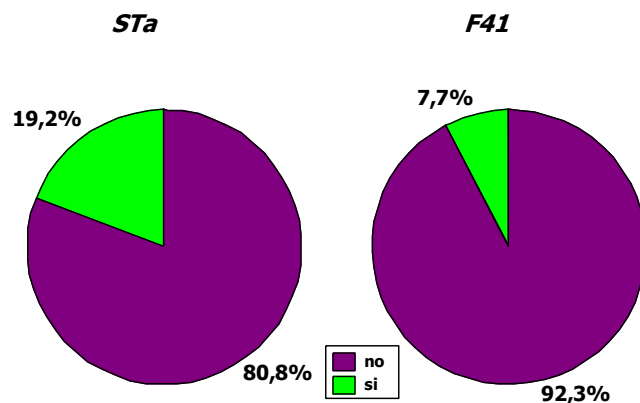


**Figura 42:** A) Porcentaje de aislados de *E. coli agn43* positivos. B) Análisis de correspondencia entre producción de biofilm sobre poliestireno/vidrio y presencia del gen *agn43*.

### 2.6.2 Detección de genes asociados a factores de virulencia (FV)

a- FV relacionados con adhesión, asociados a cepas ECPEX, y formación de biofilm (*csgA* y *agn43*) se trataron en apartados anteriores (2.6.1.b y c).

b- FV asociados a los principales patotipos intestinales que afectan a cerdos (ETEC y EPEC). Se evaluó la presencia de los genes: *STa*, *F41*, *eae* y *F5*. Ninguno de los aislados dio reacción positiva para los dos últimos; sin embargo las reacciones con los *primers* para *STa* y *F41* dieron positivas en casi el 20 y el 8% de los aislados, respectivamente (Fig. 43).



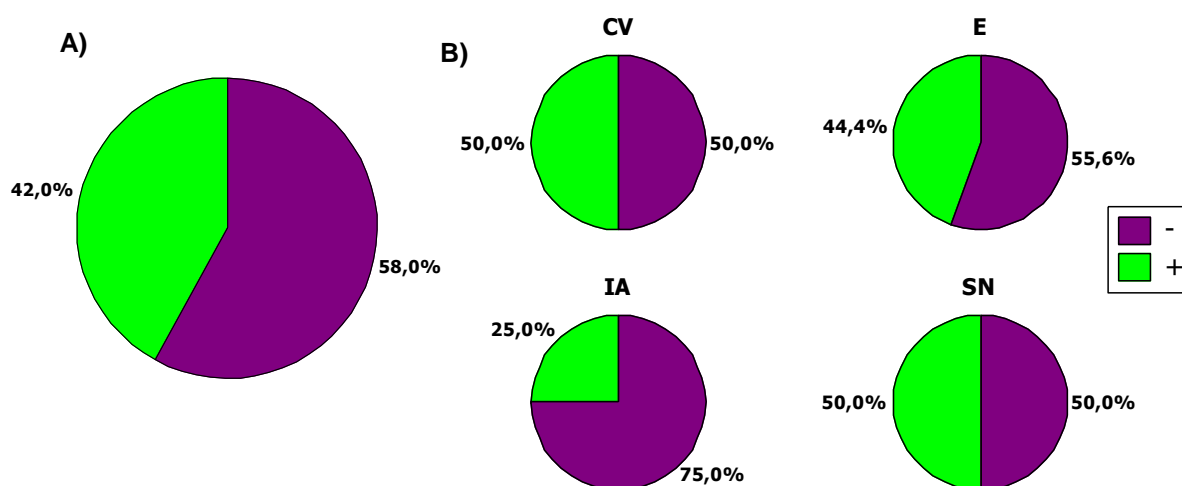
**Figura 43:** Porcentaje de aislados positivos para FV asociados a patotipos intestinales que afectan lechones.



**c-** FV relacionados con ECPEx. en ninguno de los aislados del TUG porcino se detectaron los genes asociados a: factor necrotizante citotóxico 1 (*cnf1*), invasina del endotelio cerebral (*ibeA*), determinante capsular II (*KpsII*) y al sideróforo aerobactina (*iutA*). Solamente *E. coli* LEMSA 7519 y LEMSA 7736, aisladas de U de cerdas del grupo E, resultaron positivas para el receptor del sideróforo yersiniabactina (*fyuA*). Asimismo, solo *E. coli* LEMSA 7736 resultó positiva en la reacción de PCR para hemolisina (*hlyA*).

La presencia del gen *traT*, que codifica para una protectina responsable de la resistencia al complemento, fue detectada en el 42% de los aislados del TUG porcino (**Fig. 44 A**), sin que hubieran diferencias significativas en la distribución de la prevalencia entre U y V (38,9 y 50%, respectivamente, Prueba exacta de Fisher  $p > 0,05$ ). Tampoco las hubo entre los aislados de CV (50%), SN (50%), E (44,4%) e IA (25%) (**Fig. 44 B**).

La distribución de genes de FV de ECPEx evaluados en las *E. coli* de cerdas del grupo E se muestran en la **tabla 6**, en la que puede observarse que *E. coli* LEMSA 7736 exhibió el perfil con mayor potencial patogénico.



**Figura 44: Porcentaje de aislados con reacción positiva para *traT*. A)** en el total de aislados. **B)** en los grupos de cerdas: **CV** (cachorra virgen), **SN** (cerda preñada por servicio natural), **IA** (cerda preñada por inseminación artificial) y **E** (cerdas enfermas).

A partir del análisis conjunto de la expresión de determinantes de colonización (movilidad, biofilm, expresión de fimbria curli/celulosa, expresión de fimbria manosa resistente) y la presencia de genes asociados a FV evaluados por PCR, se observó que los aislados con mejores perfiles con potencial de colonización fueron aquellos de los grupos de cerdas IA y E. Solo en aislados de cerdas IA se detectaron fimbrias manosa resistente frente a levaduras, mientras que los aislados que presentaron más FV pertenecieron al grupo de cerdas E (**Fig. 45**).

	7160	7161	7162	7164	7208	7215	7216	7217	7355	7519	V 3.3	Ur 3.3	7736	7743	7744	7745	7747	7749
<i>fimH</i> (pili tipo 1)	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>papC</i> (fimbria P)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>papAH</i> (fimbria P)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>sfa/focDE</i> (fimbria F1C)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>afa/adraBC</i> (adhesina no fimbrial)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>csgA</i> (fimbria curly)	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Agn 43</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-
<i>hly</i> (hemolisina A)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>KpsMTII</i> (capsula)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>traT</i> (protectina contra el suero)	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-
<i>ibeA</i> (invasina del endotelio cerebral)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cnf1</i> (factor necrosante)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>fyuA</i> (yersiniabactina, sideroforo)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>iutA</i> (aerobactina, sideroforo)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Filogrupo	A	D	A	A	A	D	A	A	A	A	D	B1	A	A	A	A	A	B1

**Tabla 6: Potencial patológico de *E. coli* aisladas del TUG de cerdas del grupo E (enfermas).** Con línea punteada se indica la cepa que fue positiva para la mayoría de FV (genes) evaluados. Los números indican el código de identificación del microorganismo en la colección interna de cultivos del Laboratorio de Ecología Microbiana y Sanidad Animal (LEMSA) de INSIBIO (UNT-CONICET).

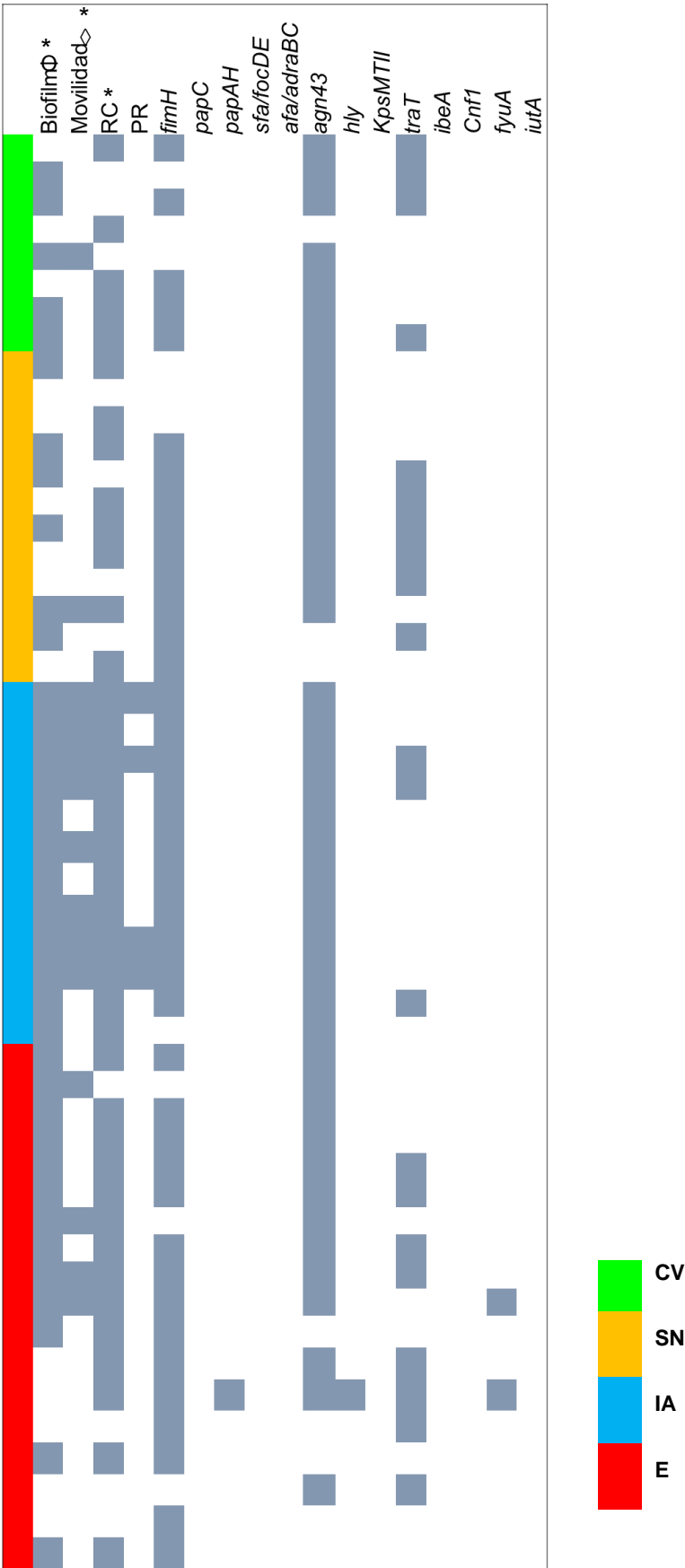


Figura 45: Determinantes asociados a adhesión y colonización presentes en los aislados de *E. coli* del TUG de CV (cachorra virgen), SN (cerda preñada por servicio natural), IA (cerda preñada por inseminación artificial) y E (cerdas enfermas). Los cuadros grises indican presencia.  $\Theta$  sobre poliestireno;  $\Diamond$  con movilidad media o alta; RC: Rojo Congo positivo; PR: fimbria manosa resistente. Se indica con \* los casos en los que se encontró asociación positiva con aislados IA Prueba exacta de Fisher,  $p < 0,05$ ).

## 2.7 Discusión

*Escherichia coli* ha sido descrita como constituyente de la microbiota indígena de vagina (V) de vacas y cerdas sanas (Bara y col., 1993; Maes y col., 1999; Otero y col., 2000; González Moreno y col., 2016; Wang y col., 2017). Sin embargo es un reconocido patógeno asociado a infecciones del TUG de cerdas durante la preñez, así como en el posparto y en la lactancia (Fairbrother y Gyles, 2012; Kirkwood y col., 2012).

Debido a estas observaciones, es de interés evaluar la presencia de *E. coli* en la microbiota del TUG de cerdas bajo diferentes condiciones del manejo reproductivo, así como su potencial capacidad patogénica durante el posparto.

Hasta nuestros conocimientos, los resultados aquí presentados informan, por primera vez, la presencia de *E. coli* en uretra (U) de cachorras y cerdas preñadas sanas, lo que aporta solidez a la hipótesis de que en todos los mamíferos el tracto urinario no es estéril, sino por el contrario alberga una microbiota autóctona (Siddiqui y col., 2011; Thomas-White, 2016; Burton y col., 2017). La mayor presencia de *E. coli* en U coincide con los hallazgos que se informaron en el capítulo 1, donde en general fue mayor la colonización de enterobacterias en U que en V. La presencia de *E. coli* en mayor porcentaje en los grupos de cerdas preñadas en comparación con las CV, permite suponer que podría existir un mayor riesgo de infecciones en dichos grupos, ya que está informado que cerdas en lactancia son más propensas a contraer IU siendo uno de los principales agentes etiológicos *E. coli* (Baricco, 2011). Asimismo, esta enterobacteria ha sido ampliamente descrita en enfermedades puerperales en vacas y cerdas (Shpigel y col., 2008; Sheldon y col., 2010; Tummaruk y col., 2010; Gerjets y col., 2011; Malinowski y col., 2011; Fairbrother y Gyles, 2012). Por otra parte *E. coli* se ha propuesto como el principal responsable de cistitis y pielonefritis en cerdas (Krag y col., 2009; Gusmara y col., 2011; Piassa y col., 2015; Moreno y col., 2017) pudiendo luego desencadenar endometritis (Biksi y col., 2002) e incluso provocar la muerte de la cerda gestante (De Paz Véliz, 2012). Moreno y col. (2017) detectaron la presencia de *E. coli* como único patógeno en el 71% de muestras de orina de cerdas con IU y en el 85% de las muestras que presentaron cultivos mixtos. Estas enfermedades alteran el rendimiento reproductivo de las hembras y su camada, lo que representa importantes pérdidas económicas para el productor (Boma y Bilkei, 2006; Sheldon y col., 2010; Gerjets y col., 2011; Wang y col., 2016).

Al contrario de lo esperado y de lo informado por Wang y col. (2017), *E. coli* no estuvo presente en un mayor porcentaje en cerdas del grupo E, lo que puede deberse a que no todas las cerdas presentaron el mismo tipo de trastorno reproductivo, como en el estudio de Wang y col., (2017) donde todas las cerdas enfermas cursaban endometritis.

Para estudiar la diversidad de los clones de *E. coli* presentes en los 4 grupos de hembras recurrimos a la amplificación de secuencias de ADN repetitivas distribuidos en los genomas bacterianos (rep-PCR por sus siglas en inglés). Los *fingerprinting* generados por métodos basados en PCR, como es el caso de la rep-PCR, suelen utilizarse para la clasificación molecular de bacterias, ya que son extremadamente confiables, rápidos, altamente discriminatorios y reproducibles (Das y col., 2014). Existen varios tipos de rep-PCR dependiendo de las secuencias que reconocen los cebadores. Entre los más utilizados en los estudios de poblaciones de *E. coli* se encuentran ERIC2-PCR y BOX-PCR (Versalovic y col., 1994; Mohapatra y col., 2007).

A pesar de la elevada similitud encontrada, tanto ERIC-PCR como BOX-PCR lograron agrupar a los aislados estudiados por categoría de origen (CV, SN, IA o E), con similitud superior al 90%. Bok y col. (2013), utilizando BOX-PCR, encontraron que las poblaciones de *E. coli* presentes en la microbiota fecal de lechones y cachorras de distintas edades fueron diferentes, por lo que postulan que las poblaciones de *E. coli* se modifican en el tiempo. Con esta metodología, en este trabajo se encontró que la población de *E. coli* de TUG de cerdas preñadas sería diferente de la población de CV y cerdas E. Nuestros resultados muestran una elevada similitud entre todos los aislados (80% para ERIC-PCR y 65% para BOX-PCR), lo que probablemente se deba a que las hembras sanas muestreadas (CV y cerdas preñadas por SN e IA) fueron de un mismo establecimiento porcicultor, relativamente pequeño y donde hay poca rotación de animales. Por lo tanto no sería extraño que la mayoría de la población de *E. coli* estudiada tenga como origen algunos pocos clones.

El estudio de la estructura filogenética de las poblaciones de *E. coli* mediante la caracterización de los filogrupos presentes, es una herramienta útil para establecer relaciones entre los aislados de *E. coli*, su lugar de origen y sus características. Nuestros resultados muestran que *E. coli* del filogrupo A predominan en la microbiota del TUG porcino, hallazgo que no sorprende ya que es el filogrupo más descrito entre las *E. coli* comensales de intestino de cerdas sanas (Bok y col., 2013). Aunque en nuestros resultados los filogrupos A y B1 fueron mayoritarios en los tres grupos de cerdas sanas, no debemos caer en la tentación de asociarlo exclusivamente con *E. coli* comensales, ya que puse ha reportado que cepas aisladas a partir de riñones de cerdas con pielonefritis pertenecieron a los filogrupos A y B1 en igual proporción (50%) (Krag y col., 2009).

Las diferencias en las conformaciones filogenéticas de los dos grupos de cerdas preñadas (IA y SN) podrían asociarse a las diferentes condiciones del manejo reproductivo, ya que se trata de dos grupos sanos y en la misma situación reproductiva, en la que la influencia hormonal sobre el microambiente del TUG es similar. Diferentes autores han propuesto que las condiciones derivadas del manejo animal en la producción pecuaria han ejercido presión de selección sobre las poblaciones de *E. coli* intestinales haciendo que los

filogrupos B2 y D se limiten y, consecuentemente, prevalezcan el A y B1 (Römer y col., 2012). Soportan esta hipótesis los estudios de Escobar-Páramo y col. (2006) quienes demostraron que además del filogrupo A, las *E. coli* de la microbiota intestinal de animales de granja se tipificaron mayoritariamente como B1 y en menor proporción como B2 y D; en el mismo estudio se comparó con la tipificación filogenética de *E. coli* aisladas de hembras de jabalí o cerdos salvajes, en los que la distribución de los filogrupos fue exactamente a la inversa: los mayoritarios fueron B2 y D. Otros autores que estudiaron *E. coli* intestinales de cerdos de granja arribaron a similares conclusiones en (Dixit y col., 2004; Schierack y col., 2007). Por su parte, Bok y col. (2015) demostraron que la estructura filogenética de las *E. coli* intestinales de vacas es diferente según el manejo de la alimentación: pastura o feedlot.

El estudio de la RAM es particularmente importante en aislados provenientes de animales destinados a consumo humano ya que estas resistencias son fácilmente transferibles a cepas de importancia clínica en humanos y animales (Rhouma y col., 2016b). Los agentes antimicrobianos se usan a menudo en el ganado como agentes terapéuticos, metafilácticos, profilácticos y promotores del crecimiento (Schwarz y col., 2001; Hammerum y Heuer, 2009; Aarestrup, 2015) y pertenecen a las mismas clases que los utilizados en los tratamientos de infecciones humanas (Schwarz y col., 2001). Aunque la Unión Europea prohibió la utilización de antibióticos como promotores de crecimiento, otros países como China, Japón, Brasil y Australia, todavía los utilizan como aditivos alimentarios para lechones (Maron y col., 2013; Zhu y col., 2013). La aplicación excesiva de antibióticos en granjas animales produce una presión selectiva favoreciendo la aparición y diseminación de bacterias resistentes, lo que representa un riesgo para la salud pública (Scientific Advisory Group on Antimicrobials of the Committee for Medicinal Products for Veterinary Use 2009; Kaesbohrer y col., 2012; Barton, 2014; de Jong y col., 2014; Wichmann y col., 2014).

El impacto del uso de antibióticos en la industria porcina ha sido ampliamente discutido (Kaesbohrer y col., 2012; Barton, 2014; Mazurek y col., 2018). En este trabajo, la mayor resistencia se detectó frente a tetraciclina (TE), lo que no sorprende ya que es un antibiótico que se aplica comúnmente en el ganado como promotor de crecimiento y para el control y tratamiento de enfermedades (Changkaew y col., 2015). Si bien en nuestro país diversos productos que contienen antibióticos están disponibles en los mercados locales, merece destacarse que la comercialización de antibióticos como aditivo alimentario se prohibirá durante el transcurso del corriente año (SENASA, resolución 594/2015),

Varios estudios destacan la presencia de resistencia a los antibióticos en *E. coli* intestinales en sistemas de cría de porcinos (Kaesbohrer y col., 2012; Callens y col., 2014; Changkaew y col., 2015). Kaesbohrer y col. (2012) reportaron porcentajes de resistencia similares a los informados en este trabajo para *E. coli* comensales aisladas de carne de cerdo. En nuestros resultados, la RAM de *E. coli* llegó al 46%, si bien es un porcentaje

considerable, es mucho menor al detectado en otros estudios para *E. coli* comensales aisladas de heces porcinas (Callens y col., 2014; Mazurek y col., 2018). Estas diferencias probablemente sean el resultado de diferencias en los programas sanitarios aplicados en el establecimiento. En un estudio realizado en Polonia en el que se analizaron *E. coli* aisladas de heces de lechones al comienzo del ciclo de producción y de cerdas al final del mismo, se encontraron aislados resistentes a antibióticos con una frecuencia del 99% en lechones y del 100% en cerdas adultas; estos aislados no solo presentaron resistencia frente a los antibióticos utilizados en el programa metafiláctico de la granja (en 5 semanas consecutivas se administraron en el alimento: sulfonamida, trimetoprima, amoxicilina y sulfaguánidina) sino también a otros antibióticos que no formaron parte de dicho programa, como ser tetraciclina y estreptomina (Mazurek y col., 2018).

La mayor presencia de RAM en los aislados de cerdas IA con respecto a cerdas SN probablemente sea producto de la selección que ejerce el empleo de antibióticos en las formulaciones de las dosis seminales utilizadas para la inseminación artificial, especialmente en el caso de estreptomina (S) el cual es uno de los antibióticos más utilizados (Johnson y col., 2000; Directiva del Consejo Europeo 90/429/CEE) y frente al que todos los aislados de CV y SN fueron sensibles.

Los resultados informados en este trabajo coinciden con estudios previos sobre MDR en *E. coli* aisladas de ganado porcino. Lay y col. (2012) informaron que más del 98% de los aislamientos intestinales de *E. coli* porcinas de animales sanos fueron MDR y que el 82% pertenecieron al grupo filogenético B1, pero ninguno al grupo A. Otro estudio describió que el 50% de los aislados de *E. coli* de riñones de cerdas con pielonefritis fueron resistentes a cuatro o más antibióticos y que de éstos el 90% perteneció al filogrupo B1 (Hancock y col., 2009). Estos autores demostraron diferencias significativas entre los filogrupos B1 y A.

Se ha informado que *E. coli* del filogrupo B2 son menos propensas a ser resistentes a los antibióticos que las cepas de los otros filogrupos (Skurnik y col., 2005). Este vínculo entre la filogenia de la cepa y la resistencia a los antibióticos podría explicar que en los animales de granja sometidos a una presión antibiótica más alta que los animales salvajes, se seleccionan las cepas de los filogrupos A y B1 sobre aquellas del filogrupo B2. De hecho los aislamientos de animales de granja son claramente más resistentes que los de animales silvestres (Skurnik y col., 2006).

En este trabajo evaluamos algunos de los factores que le permiten a *E. coli* adherirse y colonizar las mucosas de mamíferos, entre ellos la capacidad para movilizarse. A pesar de no ser esencial para la virulencia de *E. coli* uropatógena (ECUP), en humanos está demostrado que la presencia del flagelo contribuye a la patogénesis de estas cepas (Wright y col., 2005). En nuestro trabajo se observó que el tipo de manejo reproductivo influye de alguna manera en la selección de poblaciones de *E. coli* con capacidad de movilización, ya

que los aislados más móviles pertenecieron al grupo de cerdas IA, mientras que los menos móviles se encontraron en el grupo SN. Sin embargo el nicho de origen (U o V) de los aislados parece no influir en su capacidad de movilización. La mayoría de las *E. coli* de cerdas E presentaron algún tipo de movilidad, lo que coincide con lo reportado por Krag y col. (2009) para ECUP aisladas de cerdas. En ese mismo estudio, los autores observaron que los aislados de mayor movilidad presentaron menos determinantes de virulencia, por lo que en estas cepas la presencia del flagelo podría ser de importancia para su patogenicidad; además, al igual que lo reportado en este trabajo, los aislados más móviles pertenecieron al filogrupo A.

Otros de los factores que le permiten a *E. coli* adherirse y colonizar las mucosas de los mamíferos son sus fimbrias y adhesinas. En este trabajo evaluamos la expresión y la presencia de dos de ellos: el pili tipo 1 y la fimbria P.

El pili tipo 1 es una fimbria que media la unión de *E. coli* a células y tejidos del hospedador que poseen residuos específicos de manosa en su superficie. Esta fimbria se encuentra ampliamente distribuida en *E. coli* y otras enterobacterias lo que da cuenta de la importancia de esta adhesina (Klemm y Schembri, 2004). Diversos estudios indican que se requiere de estas fimbrias para que cepas ECPEx puedan establecer una infección (Hannan y col., 2012; Flores-Mireles y col., 2015; Spaulding y Hultgren, 2016). En el caso de las ECUP, la fimbria tipo 1 permite la adhesión bacteriana a células uroteliales y promueve la formación de comunidades bacterianas intracelulares (Martinez y col., 2000; Snyder y col., 2006; Wright y col., 2007; Smith y col., 2010), lo que permite la persistencia de ECUP en los hospedadores (Hannan y col., 2012). Crépin y col. (2012) demostraron que la disminución en la expresión del pili tipo 1 lleva a una reducción de la virulencia de cepas ECUP. Si bien, en nuestras observaciones en el 80% de los aislados la reacción de PCR dio positiva para el gen que codifica para la adhesina del pili tipo 1 (*fimH*), fue muy bajo el porcentaje de los mismos que mostraron su expresión en las condiciones ensayadas. Krag y col. (2009) informaron que el 75% de las *E. coli* aisladas de cerdas con pielonefritis expresó el pili tipo 1 funcional. Esta diferencia puede deberse al hecho que los autores hicieron una “pre-selección” de bacterias tomando una alícuota de la parte más superficial de un cultivo de 48 h en LB caldo e inoculando con la misma un segundo tubo con el mismo medio a partir del cual (luego de 48 h de incubación) realizaron el ensayo.

Los aislados manosa resistente (PR) frente a la aglutinación con levaduras ponen en evidencia la posible expresión de alguna de las fimbrias manosa resistente como ser fimbria G, fimbria M o M-aglutinina y la adhesina no fimbrial 1 cuyos genes no evaluamos en el presente trabajo.

La presencia de la fimbria P, codificada por los genes del operón *pap* (pili asociado a la pielonefritis), es significativamente prevalente entre las cepas de ECUP que causan



pielonefritis y se caracterizan por su adhesión (resistente a manosa) a glicolípidos que contienen el residuo Gal  $\alpha$  (1-4) Gal  $\beta$  (Proft y Baker, 2009; Gyles y Fairbrother, 2010). Si bien en este trabajo encontramos un aislado que fue positivo resistente a manosa frente a la hemoaglutinación, no dio reacción de PCR positiva para ninguno de los genes del operón *pap* evaluados (*papC* y *papAH*). Esto podría deberse a la expresión de alguna otra adhesina cuyo gen no se investigó en este trabajo. Ningún aislado evaluado dio reacción de PCR positiva para el gen *papC* y solo en el caso de *E. coli* LEMSA 7736 se logró amplificar el gen *papAH* que codifica para la subunidad estructural de la fimbria P, aunque no aglutinó GR. Por lo tanto sería importante evaluar cuál de los alelos de la adhesina (*papG*) está presente en este aislado. Están descritas tres clases de adhesinas *papG* (*PapGI*, *PapGII* y *PapGIII*) cuya prevalencia varía entre las cepas de ECUP así como su afinidad por los receptores presentes en células uroteliales y eritrocitos de mamíferos (Strömberg y col., 1991; Lane y Mobley, 2007).

Componentes de la matriz extracelular de *E. coli*, como ser fimbria curli y celulosa, participan en la capacidad de adhesión y colonización de esta bacteria. La fimbria curli pertenece a una clase de agregados proteicos estables y ordenados conocidos como amiloides (Chapman y col., 2002; Zhou y col., 2012). Estas fimbrias están involucradas en la adhesión a superficies, la agregación celular y la formación de biopelículas y son el principal componente proteico de la matriz extracelular de muchas enterobacterias (Barnhart y Chapman, 2006; Van Gerven y col., 2015). Las fimbrias curli forman una malla entrelazada que sirve de soporte para la matriz del biofilm de *E. coli* y a su vez encapsulan a las bacterias individualmente (Hung y col., 2013). Estas fimbrias median también la adhesión e invasión a células del hospedador, y son potentes inductoras de la respuesta inflamatoria del mismo (Barnhart y Chapman, 2006).

La celulosa es uno de los polisacáridos más abundantes en la naturaleza y la estructura de sus fibrillas se conserva a lo largo de la evolución, siendo la celulosa bacteriana indistinguible de la celulosa producida por algas, hongos y plantas (Limoli y col., 2015). Este polisacárido es uno de los constituyentes de la matriz extracelular de *E. coli* y otras enterobacterias (Zogaj y col., 2003) donde proporciona estructura y protección a las células bacterianas (Limoli y col., 2015).

En este trabajo de tesis se evaluó la expresión de fimbria curli y celulosa aprovechando la capacidad de estos componentes de ligar el colorante RC, donde se observaron diferentes formas de expresión (morfotipos) que dan cuenta de la variabilidad de combinaciones entre estos componentes. Además, se evaluó la presencia del gen *csgA* que codifica para la subunidad A de la fimbria curli y se comparó su presencia con la capacidad de ligar RC y con la morfología obtenida en el medio adicionado con el colorante. La mayoría de los aislados fueron RC+. Todos aquellos en los que además se detectó *csgA*

podemos decir que expresaron la fimbria en alguna medida (diversidad de morfotipos), aunque no podemos descartar que además produjeron celulosa, salvo en el caso de los morfotipos bdar y bas que solo fueron expresados por aislados *csgA*<sup>+</sup>; está descrito que estos morfotipos solo se dan en cepas que expresan fimbria curli pero no celulosa (Römling, 1998; Bokranz, 2005). Aquellos aislados que fueron RC<sup>+</sup> y *csgA*<sup>-</sup> probablemente deban su morfotipo a la expresión de celulosa en diferente medida. El morfotipo rdar fue expresado tanto por aislados *csgA*<sup>+</sup> como por *csgA*<sup>-</sup>, lo que pone en evidencia que este morfotipo puede expresarse incluso en *E. coli* que no producen fimbria curli. Anteriormente se proponía que toda cepa rdar expresaba necesariamente ambos componentes (fimbria curli y celulosa) (Römling, 1998; Bokranz, 2005), sin embargo Ma y Wood (2009) describieron que cepas de *E. coli* deficientes en la expresión de fimbria curli pueden ser capaces de sobreproducir celulosa, lo que explicaría la formación de colonias rugosas y de color rojo oscuro (rdar) de algunos de nuestros aislados *csgA*<sup>-</sup>.

La capacidad de formar biofilm es importante para el establecimiento y permanencia de las bacterias tanto en el medio ambiente como en los hospedadores. La formación de biofilm es una actividad sumamente dinámica en la que intervienen numerosos factores en el espacio y tiempo, muchos de los cuales varían dependiendo las condiciones del nicho donde se está formando (Kostakioti y col., 2013; Hufnagel y col., 2015). Es conocido que la formación de biofilm se relaciona con la capacidad de adhesión de las bacterias; para poner en evidencia esta capacidad y teniendo en cuenta que no evaluamos la presencia de todas las adhesinas informadas para *E. coli* (Korea y col., 2011), en este trabajo se decidió evaluar dos superficies (vidrio y poliestireno) bajo las mismas condiciones (medios de cultivo, tiempo y temperatura) a fin de evitar falsos negativos por fallas en la adhesión inicial. La mayoría de los aislados fue capaz de formar biofilm sobre alguna de las superficies estudiadas. Todos los aislados de cerdas IA, así como la mayoría de los de cerdas E, formaron biofilm sobre poliestireno, mientras que solo algunos lo hicieron sobre vidrio. En el caso de los aislados de CV y SN la diferencia en la capacidad de adhesión a estas superficies no fue tan marcada.

En la adhesión a poliestireno participan adhesinas como FimH y la proteína de superficie ag43 (Korea y col., 2011); de hecho, en nuestros resultados se describió asociación positiva entre los aislados *agn43*<sup>+</sup> y los formadores de biofilm sobre poliestireno. El antígeno 43 (codificado por el gen *agn43*) se encuentra en la mayoría de las cepas de *E. coli*, pudiendo estar presente en un gran número de copias en el genoma bacteriano (Klemm y Schembri, 2004). Existen diferentes alelos para *agn43* y se observó que cepas patogénicas suelen tener múltiples copias de alelos diferentes (Restieri y col., 2007). La variedad de alelos de *agn43* en una misma célula, le confieren propiedades de superficie distintas, tales como una mayor adhesión a las células del hospedador o un aumento de la agregación celular y en la producción de biopelículas en diferentes superficies (Klemm y

Schembri, 2004; Sherlock y col., 2006). Vo y col. (2017) indican que esta proteína participa tanto en la supervivencia de cepas patogénicas de *E. coli* en neutrófilos y en formación de biofilms intra y extracelulares.

Como se mencionó previamente, está reportado que la expresión de fimbria curli y celulosa también intervienen en la formación de biofilm (Kostakioti y col., 2013; Limoli y col., 2015). Al igual que lo informado por Bokranz y col. (2005) y Silva y col. (2009) se observó formación de biofilm incluso en aislados de *E. coli* que no expresaron fimbria curli y/o celulosa (RC-). En nuestro estudio la formación de biofilm sobre vidrio estuvo mayormente asociada a aquellos aislados de morfología saw, por lo que la expresión de fimbria curli y celulosa no estaría asociada a la formación de estos biofilms. Asimismo se observó una asociación significativa entre la formación de biofilm sobre poliestireno y la expresión del morfotipo rdar, lo que coincide con lo informado para cepas rdar de *E. coli* y *Salmonella* (Uhlich y col., 2006; Jain y Chen, 2007).

El hecho que los aislados provenientes de las hembras CV y SN tuvieran menos capacidad de formar biofilm sobre poliestireno que los aislados de IA da cuenta que de alguna manera el manejo reproductivo influye en la selección de estos aislados.

Además de evaluar los factores implicados en la adhesión y colonización de *E. coli*, también se evaluó la presencia en el genoma de otros FV implicados en la patogenia de cepas EPEC, ETEC y ECPEX. *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP) es responsable de la diarrea posdestete de los lechones y se caracteriza por poseer una adhesina codificada por el gen eae llamada intimina (Gyles y Fairbrother, 2010). Por otro lado, el patotipo toxigénico ECET es el principal responsable de la diarrea neonatal y se caracteriza por la presencia de adhesinas (como ser F5, F41 y F18) y de toxinas, siendo la más prevalente la toxina termoestable STa (Gyles y Fairbrother, 2010). Debido a que los lechones recién nacidos probablemente serán colonizados por poblaciones de la microbiota nativa del tracto reproductivo de las madres, decidimos evaluar estos marcadores de virulencia intestinal y observamos una baja prevalencia de los mismos entre los aislamientos de *E. coli* estudiados. Estos resultados concuerdan con un estudio anterior realizado en pandas gigantes, donde se aisló *E. coli* a partir de vagina y no se encontraron marcadores de virulencia relacionados con patotipos diarreogénicos (Wang y col., 2013). Nuestro estudio representa el primer informe sobre los FV comunes a ECEP (intimina) y ECET (F5, F41 y STa) en *E. coli* autóctona de V y U porcina. Estas características deben tenerse en cuenta ya que los lechones recién nacidos probablemente serán colonizados por estos componentes de la microbiota nativa del tracto reproductivo. En este párrafo se repite parte de la intro

Con respecto de los FV relacionados con ECPEX, solo se obtuvieron reacciones de PCR + para el gen del receptor del sideróforo yersiniabactina (*fyuA*) en dos aislados de

cerdas E (LEMSA 7519 y LEMSA 7736), este factor fue descrito por Sheldon y col. (2010) como uno de los FV destacados en las cepas endometrio patogénicas bovinas y está informado como uno de los FV característicos de ECUP productora de cistitis y pielonefritis en humanos (Brumbaugh y col., 2015). A su vez fue descrito como uno de los FV más frecuentemente encontrado en ECPEX aislados de tejidos no intestinales de porcinos enfermos en China (Tan y col., 2012), aunque en aislados de cerdas con pielonefritis solo estuvo presente en el 35% (Krag y col., 2009). Los sideróforos se unen al ión férrico y los complejos hierro-sideróforo son reconocidos por receptores afines de la membrana externa de las bacterias (Subashchandrabose y Mobley, 2015). El sideróforo yersiniabactina también une cobre, disminuyendo su toxicidad para la bacteria patógena (Chaturvedi y col., 2012). Está reportado que este sideróforo se expresó a niveles significativamente más altos en ECUP aisladas de la orina en comparación con los aislamientos rectales de los mismos individuos, lo que indica que este sideróforo podría desempeñar un papel más importante que el sideróforo enterobactina durante la adquisición de hierro dentro del tracto urinario en humanos (Henderson y col., 2009).

Solo un aislado (LEMSA 7736) dio reacción de PCR + para hemolisina A, una de las toxinas formadoras de poros mejor caracterizadas que afecta diversos tipos celulares como eritrocitos y leucocitos (Subashchandrabose y Mobley, 2015); además está informado que este FV se expresa en gran cantidad en cepas ECUP aisladas de humanos (Reigstad y col., 2007). Bicalho y col. (2010) informaron que la presencia de *hlyA* en aislados de *E. coli* de útero, se asoció a mayor riesgo de infecciones uterinas y fallas reproductivas en vacas lecheras.







En este trabajo de tesis se investigó la presencia del gen *traT* que codifica para una proteína responsable de la resistencia a la acción del complemento o protectina; la misma fue detectada en menos del 50% de los aislados y no se asoció a ningún nicho ni grupo animal. Sin embargo estudios realizados en *E. coli* aisladas de cerdos con infecciones extraintestinales describieron a este FV como uno de los más prevalentes en cepas ECPEX (Tan y col., 2012; Zhu y col., 2017).

La nula o escasa presencia de *cnf1*, *ibeA*, *afa*, *sfa/foc*, y *hly* entre nuestros aislados no sorprende ya que incluso su prevalencia fue escasa entre ECPEX aisladas de diferentes órganos de cerdos (Zhu y col. 2017); sin embargo *iutA*, *traT* y *kpsMTII* se encuentran entre los FV reportados en mayor número en ECPEX porcinas (Tan y col., 2012; Zhu y col. 2017).

Debido a que *E. coli* LEMSA 7736 fue el único aislado en el que se logró detectar más de un FV asociado a ECPEX (*fimH*, *papAH*, *hlyA*, *agn43*, *traT*, *csgA*) y a que esta cepa fue aislada de U de una cerda E, se decidió continuar con la misma para los ensayos planteados en el capítulo siguiente.

## 2.8 Conclusiones parciales

De los resultados presentados en esta etapa se concluye:

-  *E. coli* fue detectada en las microbiotas nativas de U y V de todas las categorías de cerdas evaluadas (CV, SN, IA y E), asociándose principalmente a U.
-  Las *E. coli* urogenitales porcinas de CV y cerdas preñadas por IA y SN mostraron una elevada similaridad genética (ERIC-PCR, BOX-PCR).
-  La conformación filogénica de las poblaciones de *E. coli* nativas del TUG en las categorías porcinas evaluadas, incluye los grupos A, B1 y D pero no al grupo B2.
-  Se detectó elevada antibiótico-resistencia en las *E. coli* nativas del TUG porcino y los aislados multirresistentes se asociaron al filogrupo B1.
-  La prevalencia de *E. coli* con perfiles con potencial patogénico para el TUG parece estar relacionada con la clínica y el manejo reproductivo de la hembra, ya que *E. coli* aisladas de cerdas preñadas por IA presentaron perfiles asociados a la colonización: movilidad, formación de biofilm, formación de fimbria curli y/o celulosa y presencia del gen *agn43*.
-  *E. coli* LEMSA 7736 aislada de U de cerda del grupo E, fue en la que se detectó la mayor cantidad de FV relacionados con la patogenia de cepas ECPEX.



## **CAPÍTULO 3**

**BACTERIAS LÁCTICAS NATIVAS DEL  
TRACTO UROGENITAL (TUG) PORCINO:  
ACTIVIDAD ANTAGÓNICA (AA).**

### **3.1. Bacterias lácticas presuntivas (BLp) en vagina (V) y uretra (U) de cerdas sanas (cachorras y preñadas) y enfermas (E)**

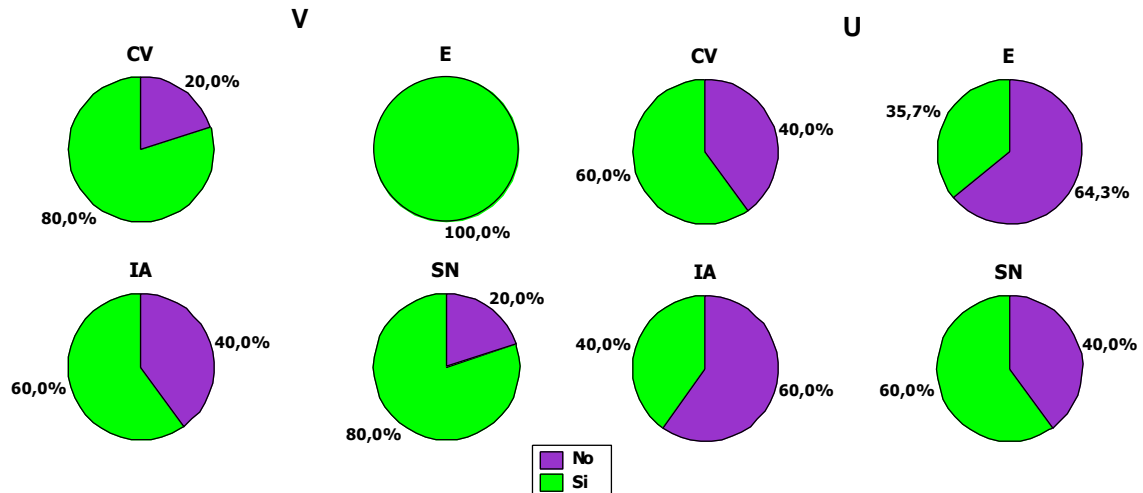
La prevalencia de BLp en las muestras del TUG de: cachorras vírgenes (CV), cerdas preñadas por servicio natural (SN), cerdas preñadas por inseminación artificial (IA) y cerdas enfermas (E), se determinó a partir del desarrollo bacteriano obtenido en medio MRS agar pH 5,5 (Materiales y Métodos, apartado IV.1.1).

Las muestras correspondientes al 93% de las cerdas fueron positivas para BLp. Su presencia se asoció principalmente al grupo CV (Prueba exacta de Fisher,  $p < 0,05$ ), habiéndose aislado en el 82% de las muestras, y en menor proporción (48%) en U.

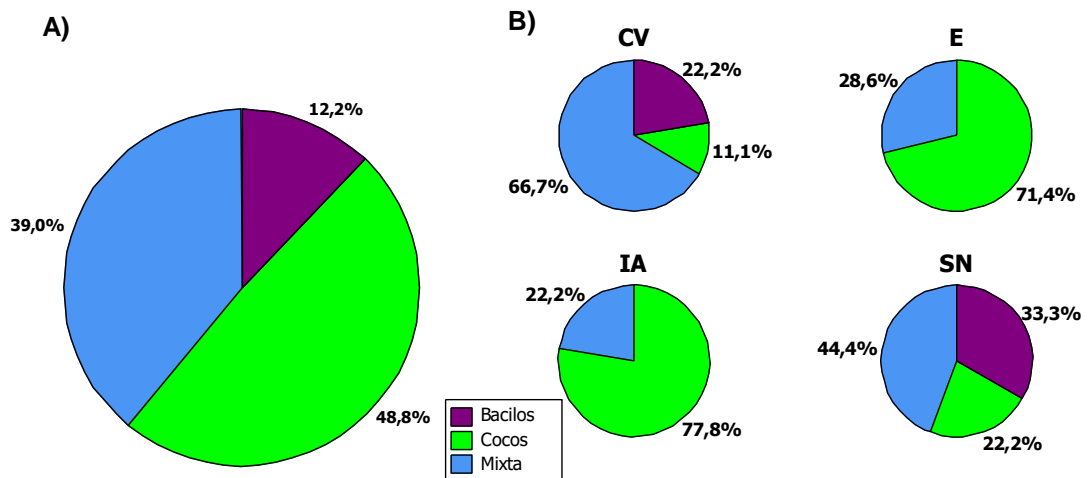
Si bien no se observaron diferencias entre las 4 categorías de hembras estudiadas, las muestras positivas para BLp correspondieron al 89, 90, 90 y 100% para los grupos IA, CV, SN y E, respectivamente. Al analizar la distribución de BLp entre V y U en cada categoría de cerda, estos microorganismos fueron encontrados en el 60, 80, 80 y 100% de las muestras de V para los grupos IA, CV, SN y E, respectivamente (**Fig. 46**), mientras que en U se detectaron en el 35,7, 40, 60 y 60% para las muestras de E, IA, CV y SN, respectivamente (**Fig. 46**).

Teniendo en cuenta la morfología de las BLp (cocos / bacilos) encontradas en el TUG de las cerdas, se observó una alta prevalencia de cocos encontrándose en el 87,8% de las hembras, ya sea como única población (48,8%) o en poblaciones mixtas (39%). Los bacilos estuvieron presentes en el 51,2% de las cerdas, se detectaron principalmente en poblaciones mixtas (39%) y solo como única población en el 12,2% (**Fig. 47 A**).

Con respecto a la distribución de las morfologías encontradas en los grupos de hembras, se encontraron cocos como única población en hembras de los 4 grupos de cerdas llegando a más del 70% en IA e E, mientras que solo el 11,1 y 22,2% de las hembras CV y SN, respectivamente, los tubo como única población. En relación a los bacilos, solo se encontraron como única población en hembras de los grupos CV y SN. En todos los grupos se encontraron poblaciones mixtas correspondiendo al 66,7, 44,4, 28,6 y 22,2 de las hembras de los grupos CV, SN, E e IA respectivamente (**Fig. 47 B**).



**Figura 46: Distribución de BLp de acuerdo al nicho y al grupo de hembras.** CV (cachorra virgen), SN (cerda preñada por servicio natural), IA (cerda preñada por inseminación artificial) y E (cerdas enfermas).



**Figura 47: Morfología de BLp** A) Respecto al total de muestras. B) Distribución de acuerdo al tipo de cerda. CV (cachorra virgen), SN (cerda preñada por servicio natural), IA (cerda preñada por inseminación artificial) y E (cerdas enfermas).



### 3.2. Perfil RAPD de los aislados de BLp (cocos y bacilos) nativas del tracto urogenital (TUG) de cachorras (CV) y cerdas preñadas (IA y SN)

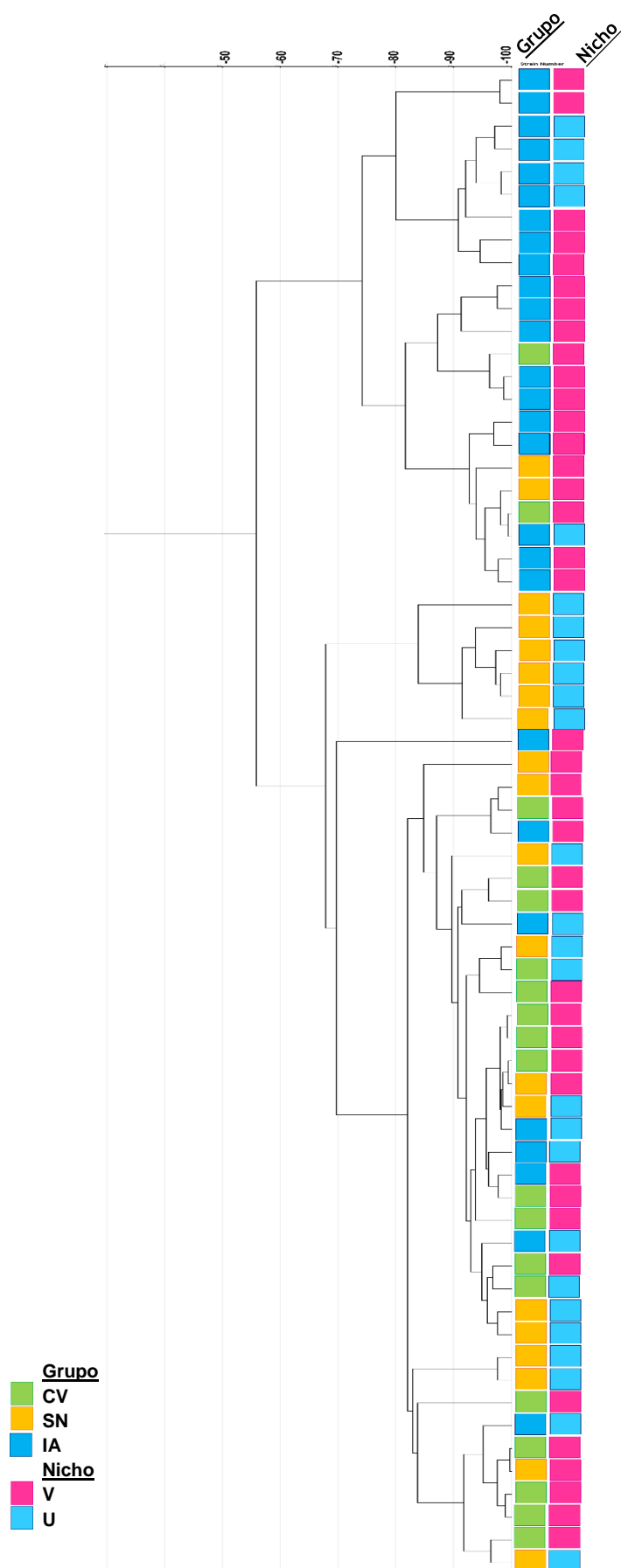
A fin de seleccionar BLp para evaluar su potencialidad probiótica se continuó trabajando con los aislados de hembras sanas (grupos CV, SN e IA). Un total de 109 BLp aisladas de: CV (n=31), SN (n=34) e IA (n=44) (Materiales y Métodos apartado IV.1.1) se evaluaron respecto de su diversidad clonal dentro de cada categoría animal empleando RAPD-PCR (Materiales y Métodos apartado IV.2). Para el análisis de los *fingerprintings* los aislados con morfología de coco se analizaron juntos y por origen (CV, SN o IA), mientras que los bacilos se analizaron en conjunto (en este caso el n fue menor).

El análisis de los *fingerprintings* obtenidos para los cocos mostró que todos los aislados compartieron al menos 55% de similitud (**Fig. 48**), los cuales se agruparon en 2 grandes clústeres con 74 y el 69% de similaridad. En el primero de éstos se agruparon la mayoría de los cocos de cerdas preñadas por IA, observándose, además, 2 subclústeres con similaridad interna del 80%: uno conformado exclusivamente por cocos de cerdas IA pero de ambos nichos (U y V) y otro en el que se agruparon cocos provenientes principalmente de V, pero de las tres categorías de hembras. El otro clúster agrupó cocos de las tres categorías de hembras y de los dos nichos estudiados; asimismo se observaron tres subclusters con más del 83% de similitud cada uno, uno de los cuales estuvo integrado exclusivamente por cocos de U de cerdas preñadas por SN (**Fig 48**).

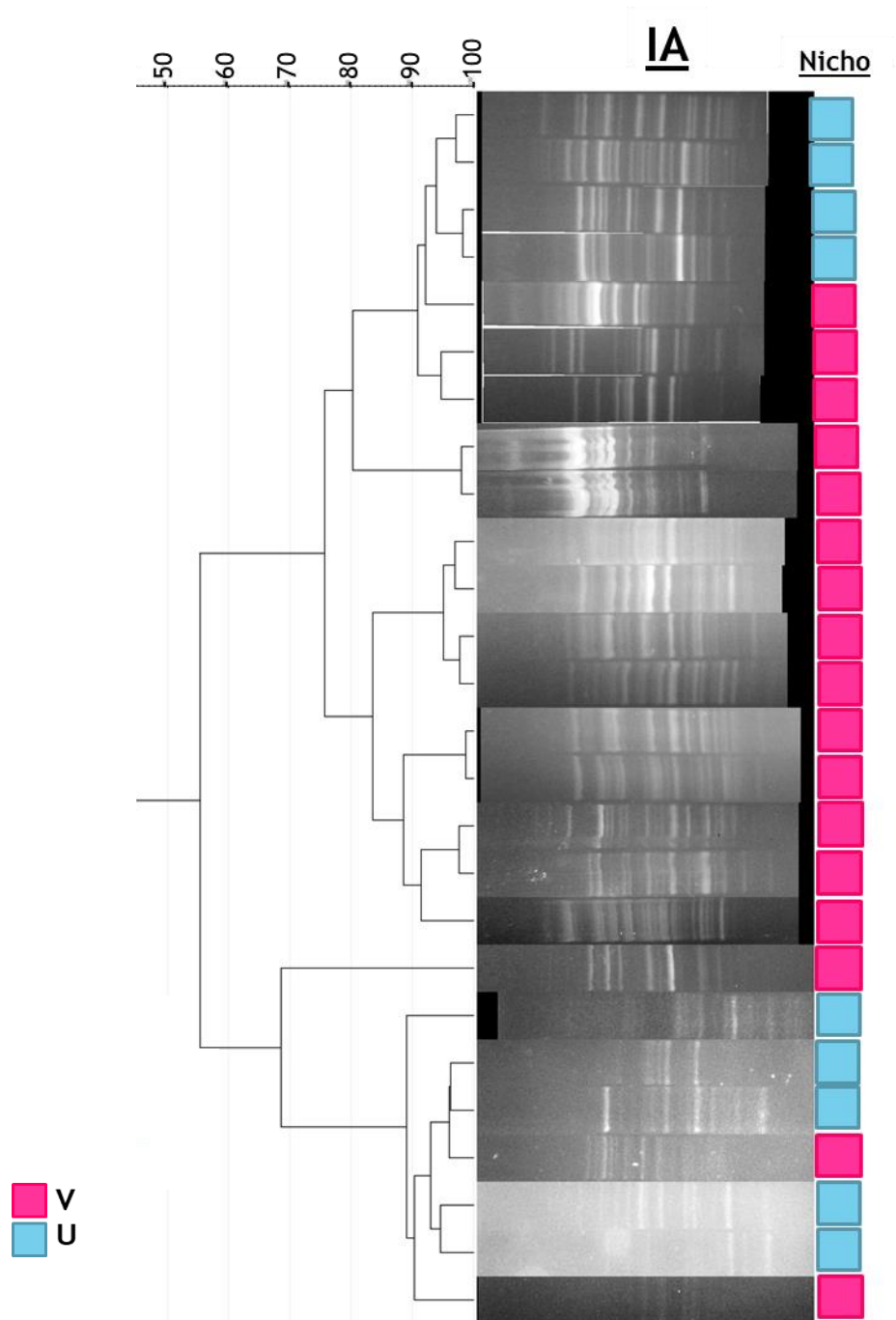
El análisis de clústeres de los patrones obtenidos para cocos en cada categoría de hembra, los reunió en grupos que coincidieron respecto del nicho del que provenían.

En el caso del grupo de cerdas preñadas por IA se obtuvieron 3 clústeres: uno de ellos compuesto exclusivamente por cocos vaginales (con al menos un 82% de similitud), y 2 clústeres de cocos uretrales que estuvieron constituidos por 2 subclústeres con similitud superior al 90% (**Fig. 49**).

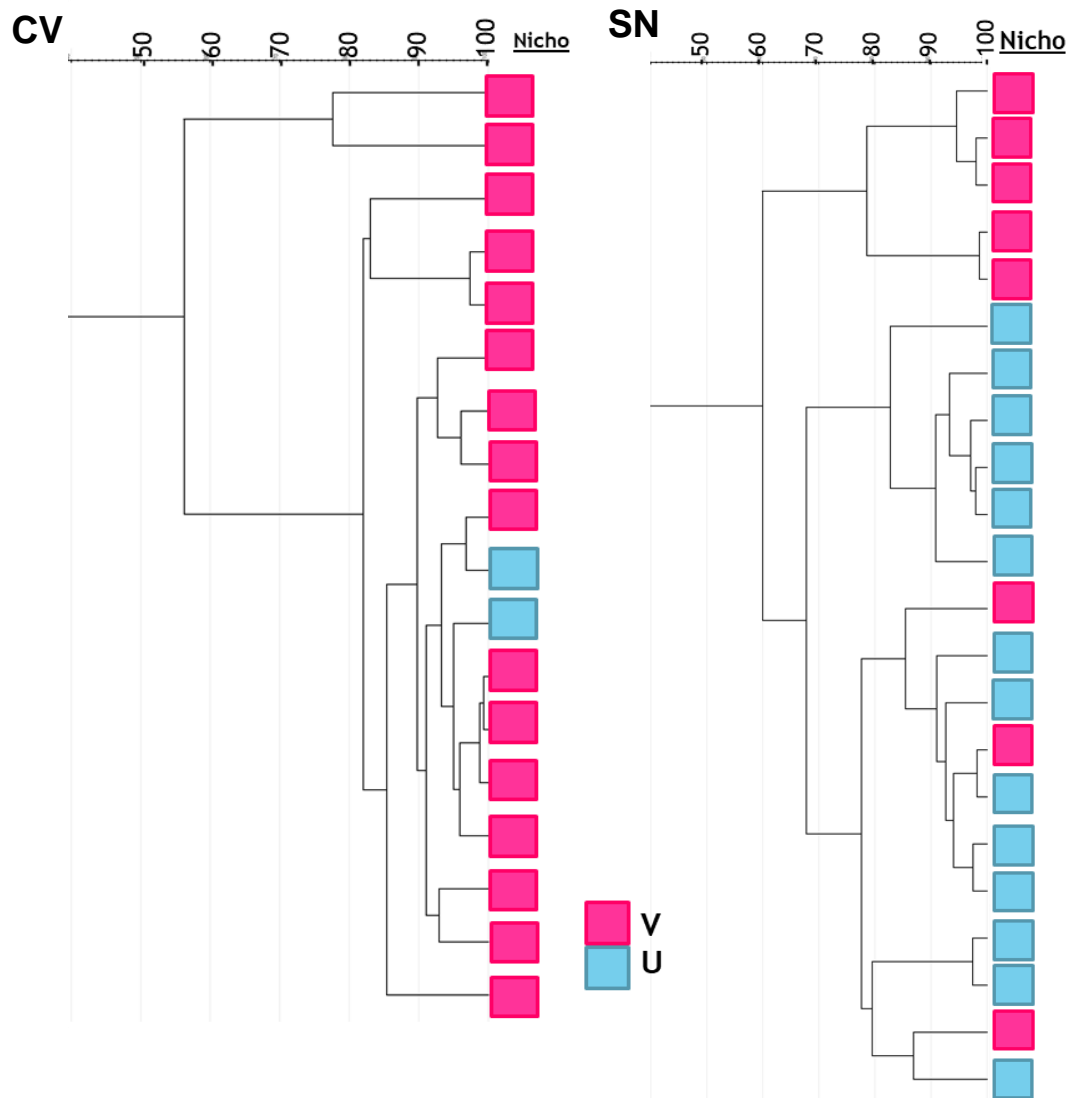
Con respecto a los cocos recuperados cerdas SN, estos se agruparon en 3 clústeres (con similitud >79%), 2 se conformaron con aislados de un solo nicho mientras que en el tercero se agruparon aislados de U y V (**Fig. 50**). Por su parte, los cocos aislados de CV fueron, en su mayoría, de origen vaginal y compartieron más del 80% de similitud (**Fig. 50**).



**Figura 48: Perfiles RAPD-PCR de BLp (cocos) aisladas de: CV** (cachorra virgen), **SN** (cerda preñada por servicio natural) e **IA** (cerda preñada por inseminación artificial). El dendrograma se generó por el método UPGMA utilizando el coeficiente de correlación de Pearson. Se indica el nicho de origen **U**: uretra; **V**: vagina).



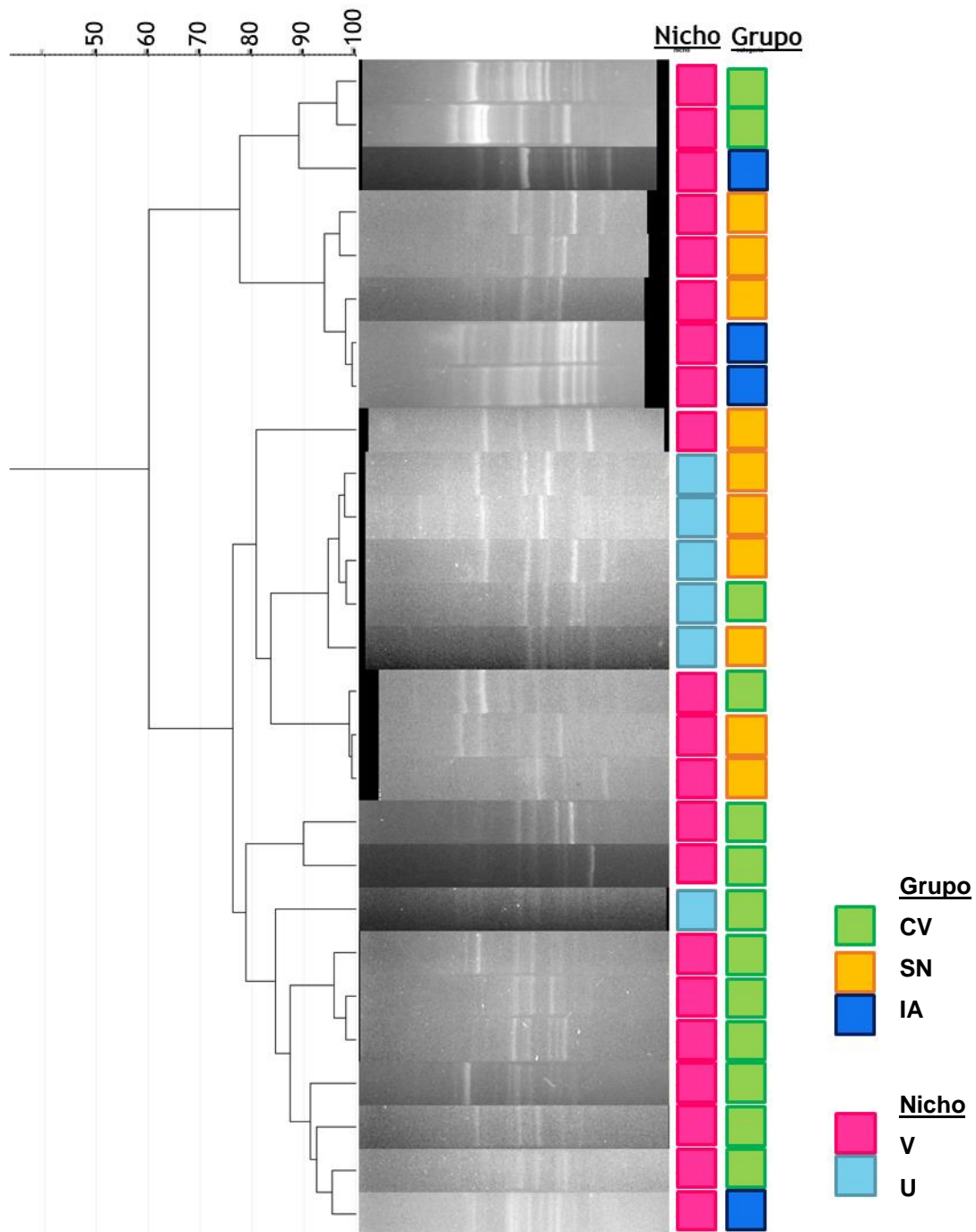
**Figura 49: Perfiles RAPD-PCR de BLp (cocos) aisladas de cerdas IA.** El dendrograma se generó por el método UPGMA utilizando el coeficiente de correlación de Pearson. Se indica el nicho de origen (**U**: uretra; **V**: vagina).



**Figura 50: Perfiles RAPD-PCR de BLp (cocos) aisladas de cachorras (CV) y de cerdas preñadas por servicio natural (SN).** El dendograma se generó por el método UPGMA utilizando el coeficiente de correlación de Pearson. Se indica el nicho de origen (U: uretra; V: vagina).

El análisis de los *fingerprintings* obtenidos para los bacilos del TUG mostró también 2 grandes clústeres: uno de ellos conformado exclusivamente por bacilos vaginales (con similitud >79%) provenientes de los tres grupos de animales, y un clúster grande que reunió perfiles de bacilos de U y V de CV y SN. Casi la totalidad de los bacilos uretrales se agruparon en un clúster menor con un 95% de similitud. Entre los agrupamientos de origen vaginal se encontraron 5 clústeres con más del 87% de similitud. Los perfiles de bacilos provenientes de un mismo tipo de hembra tendieron a reunirse en clústeres comunes (**Fig. 51**).

Aislados provenientes del mismo animal y con perfiles con similitud >95% se consideraron del mismo origen clonal. Por lo tanto de los 109 aislados originales, se continuó trabajando con 76 BLp para la evaluación de su actividad antagónica (AA).

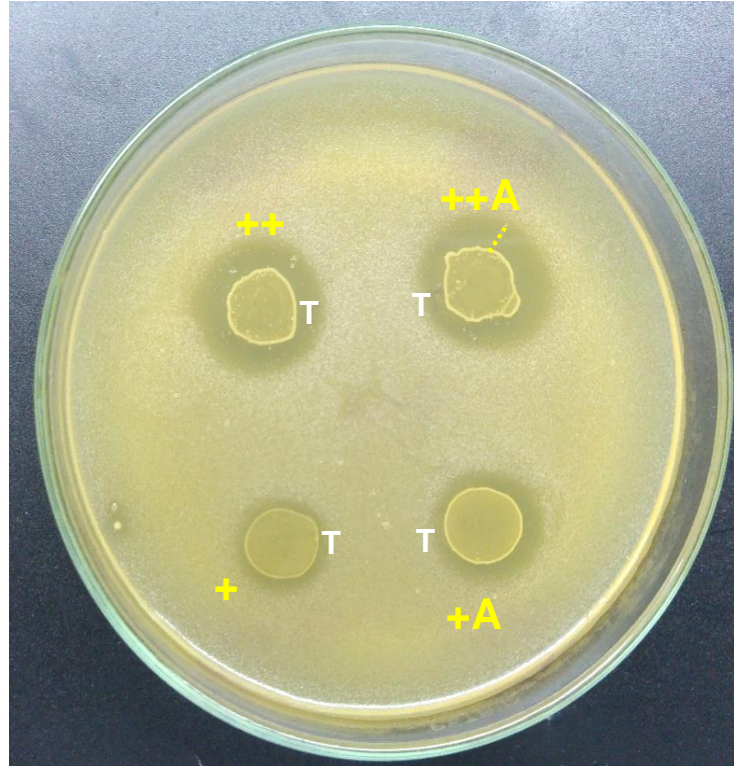


**Figura 51: Perfiles RAPD-PCR de BLP (bacilos) provenientes de: CV (cachorra virgen), SN (cerda preñada por servicio natural) e IA (cerda preñada por inseminación artificial). El dendrograma se generó por el método UPGMA utilizando el coeficiente de correlación de Pearson. Se indica el nicho de origen (U: uretra; V: vagina).**

### 3.3 Evaluación de la capacidad de síntesis de sustancias antimicrobianas

#### 3.3.1 Expresión de actividad antagónica (AA) de las BLp nativas del tracto urogenital (TUG) porcino

La AA de 76 BLp del TUG de cerdas de los grupos CV, IA y SN, se evaluó según la técnica de la “mota en césped”, con algunas modificaciones (Materiales y Métodos, apartado IV.3). Cada uno de los tres grupos de animales aportó un porcentaje similar de BLp para este ensayo (30-35%). Los microorganismos utilizados como indicadores se describen en la **tabla 4** (Materiales y Métodos). Para clasificar la inhibición detectada se tuvo en cuenta si solo se produjo sobre la super colonia de BLp o si también se formó un halo de inhibición, en este caso se midieron los mm comprendidos desde el borde de la super colonia hasta el borde del halo (**Fig. 52**); según el valor del radio del halo, se realizó una clasificación con cruces y se otorgó un puntaje, como se indica en la **tabla 7**. En el caso de observarse algún adelgazamiento del halo en el lugar donde se inoculó tripsina, se agregó una letra **A** (**Figura 52**).



**Figura 52: Tipos de inhibición observada en el ensayo de “mota en césped”.** A: indican halos en los que hubo adelgazamiento por efecto de tripsina. Línea punteada: radio del halo de inhibición. T: punto de inoculación de tripsina.

**Tabla 7: Clasificación por cruces y puntaje otorgados a los distintos tipos de inhibición observadas en el ensayo de la mota en césped.**

Tipo de inhibición	Cruces	Puntaje
Sin inhibición	–	0
Inhibición solo sobre colonia de BLp (0 mm)	±	1
Con halo ( $\leq 2,5$ mm)	+	2
Con halo (2,6 a 5,6 mm)	++	3
Con halo ( $\geq 5,7$ mm)	+++	4

Al comparar la AA con la morfología de las BLp estudiadas se observó que los cocos tuvieron mayor AA que los bacilos frente a todos los microorganismos indicadores (Prueba de LSD Fisher  $p < 0,05$ ).

La mayoría de los cocos presentaron AA (++) frente a los patógenos indicadores y un escaso porcentaje tubo AA antagónica fuerte (+++) frente a *S. epidermidis*. El porcentaje de cocos con AA negativa osciló entre el 2 y 5,9%.

Con respecto a la AA expresada por los bacilos, la mayoría de los aislados (70,8-87,5%) no inhibió a los patógenos ensayados. Entre el 4,5 y el 21,5% presentó AA (++) y ningún aislado demostró AA alta (+++) frente a ningún microorganismo indicador.

Cabe destacar que el porcentaje de aislados activos frente a todas las cepas indicadoras fue superior al 90% entre los cocos, mientras que en bacilos osciló entre un 12-28% (**Fig. 53**).

Al comparar la expresión de la actividad inhibitoria de los aislados de cada categoría de cerda, se observó que la cantidad de BLp con AA en el grupo IA fue estadísticamente superior (Prueba de LSD Fisher,  $p < 0,05$ ) que en los grupos CV y SN, independientemente del microorganismo patógeno indicador (**Fig. 54 A**).

Al analizar la AA de BLp provenientes de U y V no se encontraron diferencias significativas (Prueba de LSD Fisher,  $p > 0,05$ ) frente a *S. epidermidis*, *E. faecium*, *L. monocytogenes*, *B. pumilus* y *E. coli*; sin embargo la AA detectada frente a *S. aureus* fue significativamente mayor entre aislados de V que los de U (Prueba de LSD Fisher  $p < 0,05$ ) (**Fig. 54 B**).

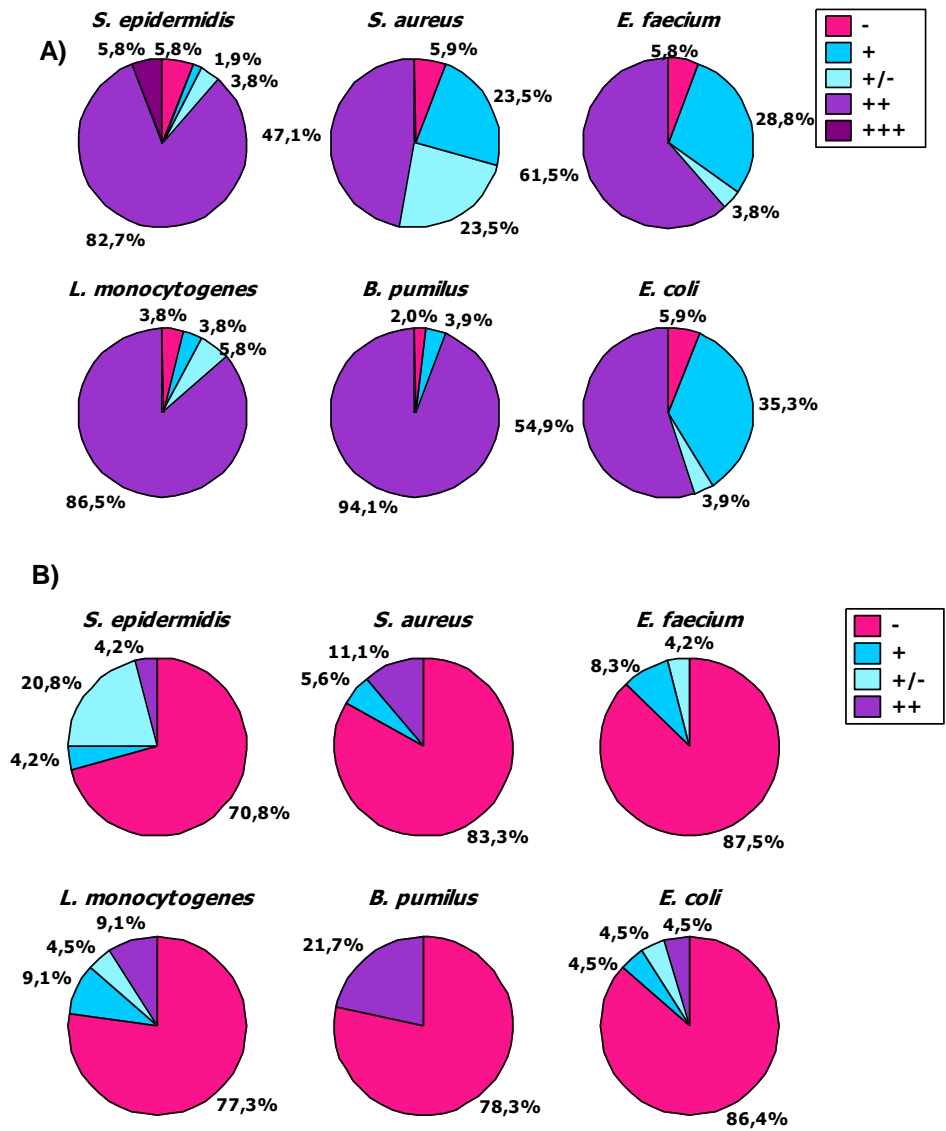


Figura 53: Actividad antimicrobiana de BLP frente a microorganismos potencialmente patógenos A) Cocos B) Bacilos.

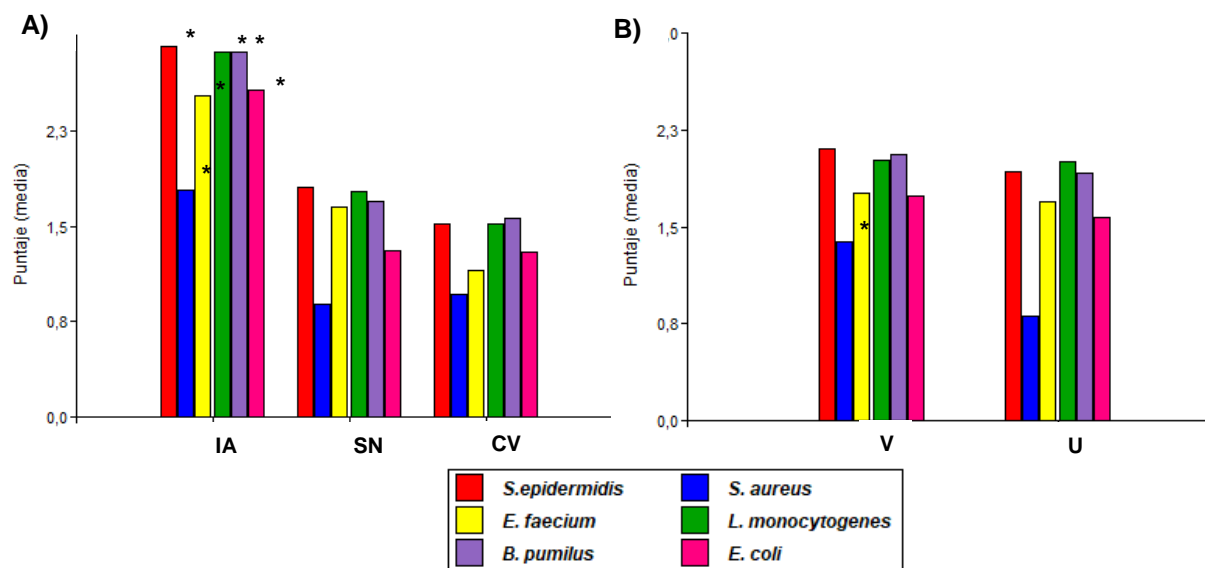


Figura 54: Actividad antagónica de las BLP en relación a: perfil de la cerda (A) y nicho (B) del cual se aislaron. \* indica diferencia significativa.



La disminución de los halos inhibitorios en presencia de tripsina solamente fue observada para el grupo de los cocos. Así, el 38,2, 15,8, 9,5 6,7, 4,4 y 4,1% de las BLp ensayadas presentó adelgazamiento de sus halos frente a *S. epidermidis*, *E. faecium*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *B. pumilus*, respectivamente (Fig. 55).

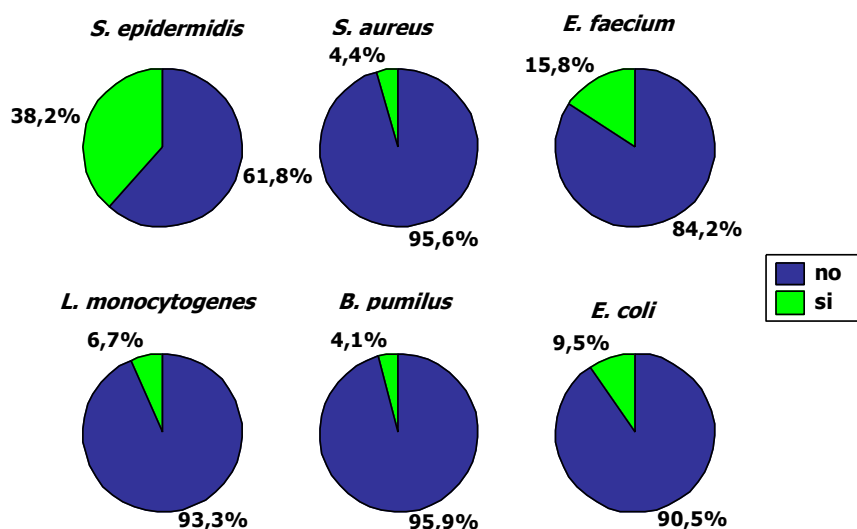


Figura 55: Distribución de BLp del TUG porcino que expresan actividad antimicrobiana sensible a tripsina

### 3.3.2 Actividad inhibitoria de los sobrenadantes libre de células (SLC) de las Bacterias lácticas presuntivas (BLp) sobre *Escherichia coli* LEMSA 7736

A partir de los resultados obtenidos en el apartado anterior se seleccionaron 5 BLp (cocos) aisladas de los 3 grupos de cerdas, que presentaron AA sensible a tripsina frente a *E. coli* LEMSA 7736 y a otros dos de los patógenos ensayados.

Las BLp seleccionadas para los ensayos en esta etapa fueron: LEMSA 5042 (de V de IA), LEMSA 5185 (de U de SN), LEMSA 5270 (de V de SN), LEMSA 5288 (de V de CV), LEMSA 5313 (de U de SN).

Como microorganismo indicador se seleccionó a *E. coli* LEMSA 7736 debido a que es autóctona del TUG porcino y mostró el mayor potencial patagénico (Capítulo 2, tabla 6).

Los SLC de las 5 BLp provocaron una pérdida significativa de viabilidad de *E. coli* LEMSA 7736 respecto del cultivo control del patógeno (valor medio viabilidad  $9,37 \pm 0,06$  y  $14,54 \pm 0,6$  Log UFC/mL, respectivamente), como se muestra en la Figura 56.

Para determinar la naturaleza química probable del/los factores responsables de la inhibición detectada, se evaluó la AA de los SLC previamente sometidos a diferentes tratamientos: neutralización, catalasa y tripsina (Materiales y Métodos, apartado IV.3.2). La

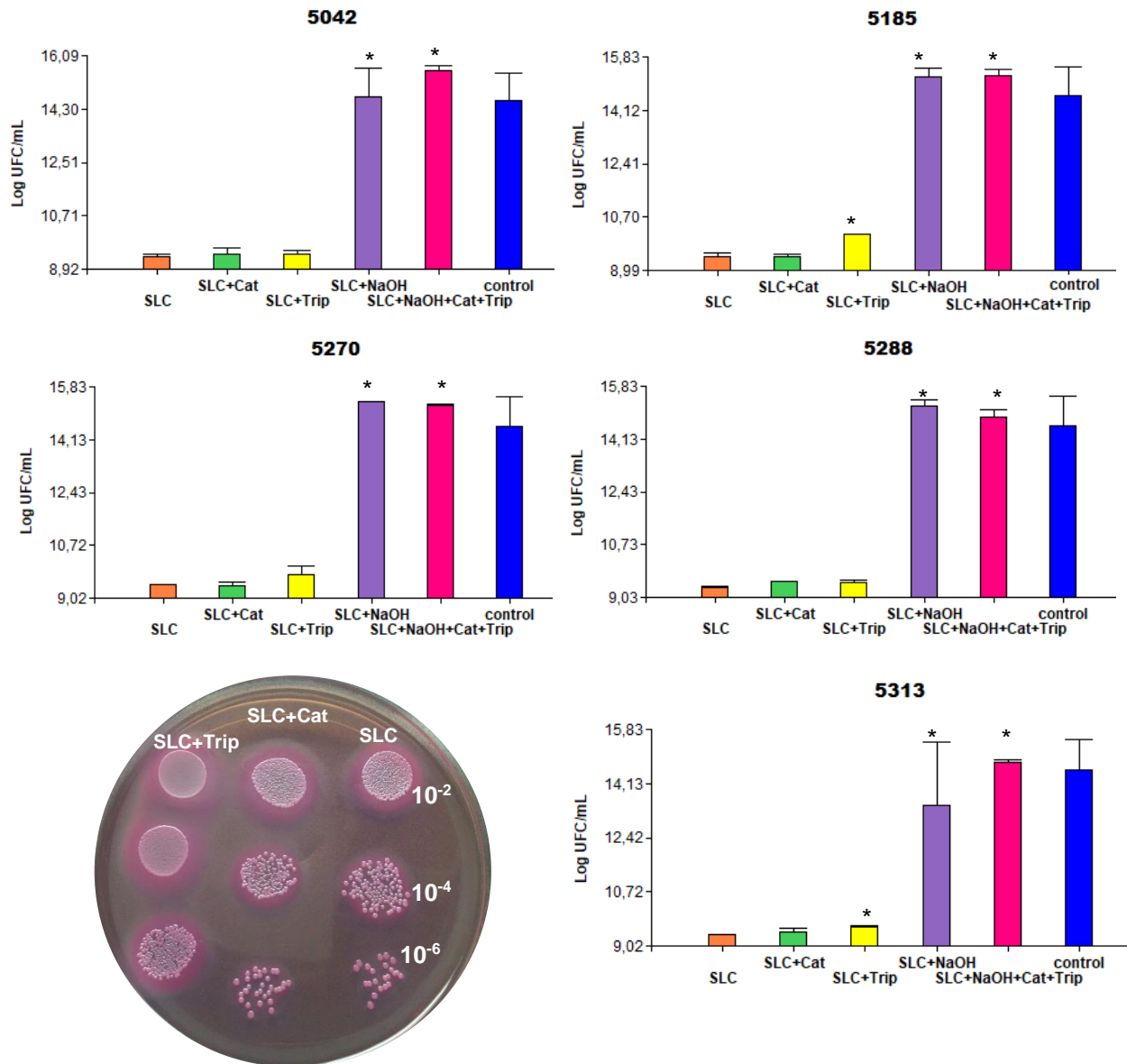
viabilidad de *E. coli* se recuperó totalmente en los 5 SLC neutralizados y en aquellos que recibieron todos los tratamientos (**Fig. 56**).

La viabilidad del patógeno no se recuperó totalmente cuando los SLC se trataron con catalasa o con tripsina. Sin embargo, los valores detectados en los SLC+tripsina fueron significativamente superiores (Prueba LSD de Fisher  $p<0,03$ ) a los del SLC crudo en los casos de las BLp LEMSA 5185 y LEMSA 5313. Esta recuperación parcial de la viabilidad fue mayor frente a LEMSA 5185 que a LEMSA 5313 ( $10,14\pm0,01$  y  $9,60\pm0,03$  Log UFC/mL, respectivamente,  $p<0,03$ ) (**Fig. 56**).

Debido a que esta actividad inhibitoria pudo deberse a la producción de algún metabolito de naturaleza peptídica, se seleccionó a LEMSA 5185 para futuros estudios.

### 3.3.3 Identificación genotípica de la BLp: LEMSA 5185

La identificación taxonómica del microorganismo seleccionado por sus propiedades inhibitorias se realizó mediante secuenciación de la región V1 del gen del ARNr16s según lo indicado en el capítulo de materiales y métodos (apartado V), LEMSA 5185 tuvo un alto grado de identidad con *Enterococcus hirae*.



**Figura 56: Efecto de sobrenadantes libres de células (SLC) de BLp sometidos a diferentes tratamientos sobre la viabilidad de *E. coli* LEMSA 7736.** ■ Cultivo control del patógeno (LAPTg caldo, T6h); ■ SLC sin tratar; ■ SLC neutralizado (SLC+NaOH); ■ SLC tratado con catalasa; ■ tratado con tripsina y ■ neutralizado, tratado con catalasa y con tripsina.

\* indica diferencias significativas con la viabilidad media en el SLC (Prueba LSD de Fisher  $p < 0,03$ ).

La placa corresponde al crecimiento *E. coli* LEMSA 7736 en SLC de *Enterococcus hirae* LEMSA

### 3.4 Discusión

Las bacterias lácticas (BL) constituyen una de las poblaciones más reconocidas y estudiadas en la microbiota del tracto genital tanto en mujeres (Zhou y col., 2004; Ravel y col., 2011) como en hembras de diferentes especies animales: primates, murinos y vacas (Reid y col 1985; Otero y col., 2000; Noguchi y col., 2004). Su rol en el ecosistema urogenital se ha asociado con un efecto benéfico, generalmente mediado por la acción inhibitoria sobre poblaciones potencialmente patógenas, previniendo el desarrollo de infecciones (Whiteside y col., 2015; Stapleton, 2016; Amabebe y Anumba, 2018b). Sin embargo poco se sabe sobre las poblaciones de BL en el TUG porcino, especialmente en V de cerdas sanas (Maes y col., 1999). Bara y col. (1993) mediante cultivos, evaluaron esta microbiota en diferentes etapas del ciclo reproductivo, sin embargo no establecieron la prevalencia de BL. En un estudio independiente de cultivo, Lorenzen y col. (2015b) determinaron la composición de la microbiota vaginal de cerdas pre-púberes y cerdas sexualmente maduras no preñadas de la raza Göttingen Minipigs, que no es utilizada en producción pecuaria. Estos autores encontraron una mayor prevalencia de bacterias de la familia *Lactobacillaceae* (que incluye los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus*) en el grupo de cerdas pre-púberes respecto de las sexualmente maduras, mientras que no detectaron diferencias entre otras familias como ser *Streptococcaceae* (que incluye al género *Lactococcus*). En nuestros hallazgos, no se observaron diferencias en la prevalencia de aislamientos positivos de BLp en el TUG de las hembras de los grupos CV, IA, SN y E, probablemente porque todas, incluso las cachorras, estuvieron en un estadio de madurez sexual; es factible que sea el factor hormonal uno de los principales determinantes de la colonización del TUG por BL, como se ha reportado en humanos, primates, murinos y bovinos (Otero y col., 1999; Noguchi y col., 2003; Gonzalez Moreno y col., 2016; Miller y col., 2017; Vitali y col., 2017; Amabebe y Anumba, 2018b).

Sin embargo, en un estudio reciente de la microbiota vaginal de cerdas adultas sanas y con endometritis, no se informaron a las BL como una población mayoritaria (Wang y col., 2017). Incluso en nuestro trabajo, mediante DGGE (Capítulo 1, apartado 1.3.2), se describió que la población de BL fue detectada en mayor proporción en las cachorras (CV) y cerdas preñadas por SN, que en las preñadas por IA. Estas discrepancias entre resultados obtenidos a partir de aplicar diferentes metodologías para la evaluación de microbiotas de un nicho determinado, ya fue informado en otros trabajos (Fontana y col., 2010; Gonzalez Moreno y col., 2016).

Cabe recordar que el género *Lactobacillus* se asoció principalmente a hembras CV y SN tanto en V como en U (Capítulo 1, apartado 1.3.2), lo que coincide con lo observado en esta etapa, en la que mediante técnicas dependientes de cultivo, se detectó mayor presencia de BLp (bacilos) en estos dos grupos de hembras comparados con el grupo IA.

Los bacilos estuvieron más relacionadas con la colonización vaginal, mientras que los cocos se detectaron en mayor proporción en U. No se registran en la literatura antecedentes que describan la presencia de una microbiota normal, ni de BL, en la U porcina; sin embargo diferentes trabajos señalan que U alberga una microbiota autóctona diferente de la de V (Siddiqui y col., 2011; Burton y col., 2017), y que las características de la misma influyen en la sanidad del tracto urinario (Whiteside y col., 2015; Tomas-White y col., 2016; Gottschick y col., 2017).

Como se mencionó anteriormente, las BLp (tanto cocos como bacilos) están presentes en cerdas sanas (CV, SN, IA) como en cerdas enfermas (E); similares observaciones reportaron Wang y col. (2013b) en muestras de V de vacas preñadas tanto sanas como con metritis, y describieron la presencia de los géneros *Enterococcus*, *Lactobacillus* y *Pediococcus* en ambos grupos de animales.

Es probable que no sea la magnitud de colonización sino las características particulares de los clones presentes en las poblaciones lácticas vaginales, las que se asocian con la salud del tracto, tal como se ha descrito en mujeres. Por lo tanto adquieren relevancia estudios que caracterizan propiedades asociadas al efecto benéfico esperado en este tipo de nichos (adhesión, producción de metabolitos antimicrobianos, interacción con el sistema inmune de mucosa, etc) tal como se ha descrito para BL benéficas en el TUG de mujeres (Witkin y col., 2013; Stapleton, 2016; Smith y Ravel, 2017; Amabebe y Anumba, 2018b) y de hembras bovinas (Otero y col., 2006).

La diversidad de las poblaciones de BL nativas del TUG ha sido ampliamente discutido en el caso de mujeres, asociándose a diferentes situaciones reproductivas y de susceptibilidad a infecciones (Zhou y col., 2004; Whiteside y col., 2015; Schneeweiss y col., 2016; Freitas y col., 2017; Amabebe y Anumba, 2018b; Matsumoto y col., 2018). En nuestro trabajo evaluamos la heterogeneidad de las poblaciones de BLp aisladas del TUG de las CV y de cerdas preñadas (SN e IA), mediante amplificación al azar del ADN polimórfico (RAPD-PCR). Esta técnica suele utilizarse en conjunto con la amplificación y secuenciación del gen del 16S ARNr, para evaluar la diversidad de clones presentes en muestras con microbiotas poco complejas como las de alimentos (Fontana y col., 2005; Fontana y col., 2016). Los estudios generalmente identifican las BL y luego las someten a RADP-PCR, o lo realizan como un *screening* a fin de seleccionar aislados representativos de cada origen clonal. En este trabajo, se decidió aplicar esta técnica como una herramienta para evaluar la diversidad de poblaciones de cocos y bacilos recuperados del TUG de cerdas. La utilización de un solo cebador seguido del análisis de clúster no permite revelar la identidad de los aislamientos a nivel de especie (Mohania y col., 2008). Sin embargo, una clusterización asociada a variables independientes (como el nicho de origen o el perfil de la cerda de la cual fue aislado) permite realizar un enfoque del análisis para estimar el grado de diversidad de las

poblaciones de BL, lo que estaría en concordancia con lo planteado por Mohania y col. (2008). Una elevada similaridad se detectó en poblaciones de cocos recuperados de cada grupo animal (CV, SN, IA) independientemente del nicho y animal de origen, por lo que inferimos que no hay demasiada variabilidad entre los integrantes de esta población de BL del TUG. Del mismo modo, en el grupo de bacilos, la similaridad fue elevada entre muestras del mismo nicho o grupo de animal, coincidiendo con lo observado en el Capítulo 1 (apartado 1.3.); a pesar de las limitaciones de la DGGE, a nivel de género, se pudo observar coincidencia entre lactobacilos detectados en U como en V de cerdas de la misma categoría (SN).

El mantenimiento de una microbiota equilibrada en el TUG de las cerdas podría evitar el desarrollo de infecciones posparto y favorecer el establecimiento de una microbiota benéfica en sus camadas, disminuyendo en éstas el riesgo de muerte por infecciones. A fin de establecer las bases del diseño de un producto probiótico que permita enriquecer el TUG de cerdas con microorganismos benéficos, se estudió la capacidad de las BLp para inhibir el desarrollo de *S. epidermidis*, *S. aureus*, *E. faecium*, *L. monocytogenes*, *B. pumilus* y *E. coli*, todos ellos aislados del TUG de cerdas E. Se demostró que la mayoría de los cocos y solo algunos bacilos fueron capaces de inhibir el desarrollo de estos patógenos, y que la mayor AA se presentó entre BLp de cerdas IA lo que probablemente se deba a la menor proporción de bacilos en este grupo comparado con los otros dos grupos de animales (CV y SN). Algunos estudios han evaluado la utilización de BL combinada con cepas de *Bacillus* y *Clostridium* en la alimentación de cerdas para mejorar su salud y la de la camada (Hayakawa y col., 2016); sin embargo los investigadores utilizaron cepas comerciales cuyo origen no se especifica en el trabajo.

La actividad antimicrobiana frente a patógenos es uno de los aspectos a considerar al momento de seleccionar microorganismos con potencial probiótico (Shokryazdan y col., 2017). En general, las sustancias antimicrobianas producidas por BL se pueden dividir en dos grupos principales: sustancias antimicrobianas no bacteriocinas y las bacteriocinas (Collins y col., 2009). Entre las sustancias antimicrobianas no bacteriocinas encontramos: ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, diacetilo, acetaldehído, acetoína, ácido feniláctico, ácido 4 hidroxifeniláctico, ácidos grasos 3-hidroxi, entre otros, y se ha reportado que pueden afectar a microorganismos de diferentes grupos taxonómicos, incluyendo bacterias, hongos y protozoos (Suskovic y col., 2010). El segundo grupo de compuestos antimicrobianos o bacteriocinas son péptidos de bajo peso molecular (Dicks y col., 2011; Juturu y Wu, 2018) que generalmente inhiben a otras BL, algunas Gram negativas y bacterias Gram positivas que deterioran alimentos (Quintana y col. 2017; Sarika y col. 2017).

En nuestro trabajo encontramos que la mayoría de los cocos y solo algunos lactobacilos fueron capaces de producir compuestos antimicrobianos de tipo no bacteriocina,

mientras que solo un grupo reducido de los cocos produjo una sustancia inhibitoria parcialmente sensible a tripsina, lo que se puso en evidencia al observarse una disminución parcial del halo de inhibición en presencia de esta enzima. Por lo que consideramos que se trata de una probable bacteriocina de acción frente a bacterias Gram positivas y negativas. Sin embargo deben ensayarse otras enzimas proteolíticas ya que algunos autores demostraron la desaparición casi completa del halo de inhibición cuando se utilizó proteinquinasa K (Wang y col., 2013b). No sorprende que este tipo de actividad antimicrobiana se detectara en el grupo de los cocos, ya que se ha informado que los géneros *Enterococcus*, *Pediococcus*, y *Lactococcus* son buenos productores de bacteriocinas (Hanchi y col., 2018; Wang y col., 2013b; Borges y col., 2013) algunos de los cuales inhiben a Gram negativas (De Kwaadsteniet y col., 2005; Hanchi y col., 2016; Quintana y col., 2017).

Mediante tratamientos del sobrenadante libre de células de la BLp LEMSA 5185 (autóctono de TUG porcino) se determinó que la inhibición sobre la viabilidad de *E. coli* LEMSA 7736 (TUG porcino, grupo E, con mayor potencial patogénico, Capítulo 2), se debe probablemente a la acción de ácidos orgánicos y de una sustancia de naturaleza peptídica (probable bacteriocina). Numerosos reportes mencionan la capacidad de BL de inhibir el desarrollo de enterobacterias. Cocos aislados de V de vacas sanas demostraron tener actividad antimicrobiana frente a una cepa de *E. coli* aislada de vacas con endometritis (Zhao y col., 2015). Asimismo, Genís y col., (2016) demostraron el potencial de algunas BL para modular la infección endometrial producida por *E. coli* en vacas en posparto. Finalmente, se demostró que Lactobacilos aislados de leche de cerdas inhibieron el desarrollo de *Salmonella*, ECEH y ECET (Quilodrán-Vega y col., 2016).

La BLp seleccionada en este trabajo fue identificada como *Enterococcus hiriae* LEMSA 5185. Un número considerable de cepas que pertenecen a diferentes especies de *Enterococcus* son altamente competitivas debido a su resistencia a un amplio rango de pH y temperatura. Su competitividad también se debe a su capacidad para producir bacteriocinas reconocidas por su amplia efectividad en bacterias patógenas y causantes de deterioro alimentario principalmente Gram positivas, como *L. monocytogenes* (Hanchi y col., 2018) e incluso frente a Gram negativas (De Kwaadsteniet y col., 2005; Hanchi y col., 2016). Algunos miembros de este género se utilizan como probióticos y como aditivos para piensos para prevenir la diarrea o mejorar el crecimiento en animales (Taras y col., 2006; Franz y col., 2011). Asimismo, las bacteriocinas enterocócicas han atraído un gran interés de investigación como agentes antimicrobianos naturales en la industria alimentaria, y se consideran como una alternativa prometedora para combatir la resistencia antimicrobiana emergente (Cotter y col., 2013; Hammami y col., 2013). Dentro del género *Enterococcus*, *E. faecium* y *E. faecalis* son las especies más estudiadas y las mayores productoras de





bacterocinas seguidas, en menor medida, por *E. mundii*, *E. avium*, *E. hirae* y *E. durans*. (Hanchi y col., 2018).

Así como se demostró en *Enterococcus hirae* LEMSA 5185, otros *E. hirae*, aislados de V humana fueron capaces de inhibir el desarrollo de patógenos como *L. monocytogenes*, *E. coli* y *S. aureus* e incluso produjeron un péptido con acción anticancerígena (Sharma y col., 2018). Estudios recientes indican que bacteriocinas producidas por cepas de *E. hirae* aisladas de alimentos, fueron efectivas frente a reconocidos patógenos Gram positivos y Gram negativos como *S. aureus*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, ECUP y *Vibrio* sp. (Gupta y Tiwari, 2015; Gupta y col., 2016; Cavicchioli y col., 2017). En base a los resultados obtenidos en este trabajo se seleccionó a *Enterococcus hirae* LEMSA 5185 para posteriores estudios que permitan su inclusión o la de sus metabolitos, en un protocolo de manejo reproductivo de cerdas a fin de favorecer la salud del TUG de la hembra durante la preñez y lactancia.



### 3.5 Conclusiones parciales


De los resultados presentados en esta etapa se concluye:


-  La contribución de la población de Bacterias Lácticas presuntivas (BLp) a la microbiota del TUG depende de la clínica y de la situación reproductiva de las cerdas.
-  Por primera vez se describe la presencia de poblaciones de BLp en la microbiota uretral de cerdas sanas (CV, SN e IA).
-  Las BLp con morfología de cocos son las que mejor expresan actividad antimicrobiana, en numerosos casos por una sustancia probablemente de origen peptídico y activa frente a potenciales patógenos del TUG porcino.
-  *Enterococcus hiriae* LEMSA 5185 y sus metabolitos, presentan características prometedoras como candidatos para ser incluidos en un protocolo de manejo reproductivo de cerdas, a fin de favorecer la salud del TUG de la hembra durante la preñez y lactancia.





# **CONCLUSIONES GENERALES Y PROYECCIONES**


## CONCLUSIONES GENERALES


 Los resultados de este trabajo de tesis aportan evidencias al conocimiento de las comunidades bacterianas autóctonas del TUG porcino, así como a la influencia que reciben las mismas como consecuencia del manejo reproductivo.

 Por primera vez se describe la microbiota autóctona en uretra de cachorras y cerdas sanas.









 Se profundizó en el conocimiento de *Escherichia coli* nativas del TUG demostrando que poblaciones con propiedades de patogenicidad asociadas a colonización y resistencia antimicrobiana, se seleccionan cuando se aplican protocolos de IA para conseguir la preñez.

 El protocolo de IA también selecciona poblaciones de Bacterias Lácticas con propiedades inhibitorias, especialmente cocos con actividad antimicrobiana frente a patógenos del TUG porcino.

 *Enterococcus hiriae* LEMSA 5185, aislado de uretra de cerda preñada por SN, produce una sustancia de probable naturaleza peptídica, que inhibe a *Escherichia coli* LEMSA 7736, aislada de cerda enferma y seleccionada por el perfil más patogénico.

 La BL seleccionada presenta características prometedoras para su inclusión o la de sus metabolitos, en un producto destinado a controlar la colonización de *E. coli* en el TUG de cerdas preñadas.




















## PROYECCIONES

-  Evaluar la capacidad de adhesión a células del TUG porcino, en modelos de cultivos celulares, de los aislados de *E. coli* que mostraron capacidad de formar biofilm y expresar fimbria curli/celulosa.
-  Estudiar la presencia de genes de resistencia a antimicrobianos en aquellos aislados que presentaron multirresistencia.
-  Profundizar en el estudio de la diversidad clonal de las *E. coli* nativas del TUG porcino mediante el sistema EcMLST, a fin de determinar si ST conocidas se asocian con las de cerdas E, con los perfiles más patogénicos o la multirresistencia.
-  Estudiar la resistencia a colistina en los aislados de *E. coli* porcinos y evaluar el determinante *mcr* en los casos que se detecte resistencia.
-  Determinar mediante PCR la presencia de otros factores de virulencia asociados a cepas ECPEX, como ser: *neuC*, *ompA*, *iroN*, así como los diferentes alelos descritos para *agn43* y *papG*.
-  Evaluar la capacidad de adhesión y colonización de *E. hirae* LEMSA 5185 y de BLp productoras de metabolitos antagónicos frente a *E. coli*, mediante la evaluación de sus propiedades de superficie (hidrofobicidad de la superficie bacteriana y autoagregación), producción de exopolisacáridos y formación de biofilm, y adhesión a células epiteliales porcinas.
-  Identificar genotípicamente las BLp seleccionadas como potenciales probióticas y, en éstas así como en *E. hirae* LEMSA 5185, evaluar aspectos de seguridad *in vitro*.
-  Caracterizar químicamente la molécula de origen peptídico producida por *E. hirae* LEMSA 5185, considerando la posibilidad de usar el metabolito antagónico para el control de *E. coli* patogénicas en el TUG porcino.























## BIBLIOGRAFÍA

- Aarestrup, F.M. 2015. The livestock reservoir for antimicrobial resistance: a personal view on changing patterns of risks, effects of interventions and the way forward. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 370:1617.
- Ahmed F.E. 2003. Genetically modified probiotics in foods. *Trends Biotechnol.* 21(11): 491-497.
- Ahasan A.S.M.L., Agazzi A., Invernizzi G., Bontempo V., Savoini G. 2015. The beneficial role of probiotics in monogastric animal nutrition and health. *J Dairy Vet Anim Res.* 2:00041.
- Amabebe E., Anumba D.O.C. 2018a. Psychosocial stress, cortisol levels, and maintenance of vaginal health. *Front. Endocrinol.* 9:568. doi: 10.3389/fendo.2018.00568
- Amabebe E., Anumba D.O.C. 2018b. The vaginal microenvironment: the physiologic role of lactobacilli. *Front Med (Lausanne).* 13(5):181.
- Almond G.W., Flores W., Batista L., D'Allaire S. 2006. Diseases of the reproductive system en "Diseases of swine". Editado por B.E. Straw., J.J Zimmerman., T. D'Allaire, DJ. Ames. Blackwell Publishing. pp. 113-147.
- Anuario Porcinos 2017. Área Porcinos. Dirección de Porcinos, Aves de Granja y no Tradicionales Dirección Nacional De Producción Ganadera. Ministerio de Agroindustria. [https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/porcinos/estadistica/\\_archivos//000005-Anuario/170000-Anuario%202017.pdf](https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/porcinos/estadistica/_archivos//000005-Anuario/170000-Anuario%202017.pdf).
- Bara M.R., McGowan M.R., O'Boylet D., Cameron R.D.A. 1993. A study of the microbial flora of the anterior vagina of normal sows during different stages of the reproductive cycle. *Aust. Vet. J.* 70:256–259.
- Baricco G. 2011. Urinary tract infections (UTI) in the lactating sows: is it a real problem? [https://www.pig333.com/articles/urinary-tract-infections-uti-in-the-lactating-sows-is-it-a-real-pro\\_5045/](https://www.pig333.com/articles/urinary-tract-infections-uti-in-the-lactating-sows-is-it-a-real-pro_5045/).
- Barnhart M.M, Chapman M.R. 2006. Curli biogenesis and function. *Annu. Rev. Microbiol.* 60:131–147.
- Barrales A .H., Cappuccio J., Machuca M., Williams S. 2016 Evaluación del descarte en cerdas: causas, registros reproductivos e inspección en planta de faena. *Analecta Vet.* 37:6.
- Barton M.D. 2014. Impact of antibiotic use in the swine industry. *Curr Opin Microbiol* 19: 9–15.
- Bej A.K., Mahbubani M.H., Dicesare J.L., Atlas R.M. 1991. Polymerase chain reaction-gene probe detection of microorganisms by using filter-concentrated samples, *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3529–3534.
- Beloin C., Roux A., Ghigo J.M. 2008. *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol.* 322: 249–289.
- Ben Lagha A., Haas B., Gottschalk M., Grenier D. 2017. Antimicrobial potential of bacteriocins in poultry and swine production. *Vet Res.* 48(1):22.
- Bentur H.N., Dalzell A.M., Riordan F.A.I. 2007. Central venous catheter infection with *Bacillus pumilus* in an immunocompetent child: a case report. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 6:12.
- Bertani G. 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 62:293-300.
- Bertoldo M.J., Holyoake P.K., Evans G., Grupen C.G. 2012. Seasonal variation in the ovarian function of sows. *Reprod Fertil Dev.* 24:822–834.
- Biksi I., Takacs N., Vetesi F., Fodor L., Szenci O., Fenyő E. 2002. Association between endometritis and urocystitis in culled sows. *Acta Vet Hung.* 50:413–423.
- Blanco M., Padola N.L., Krüger A., Sanz M.E., Blanco J.E., González E.A., Dahbi G., Mora A., Bernárdez M.I., Etcheverría A.I., Arroyo G.H., Lucchesi P.M., Parma A.E., Blanco J. 2004. Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina, *Int. Microbiol.* 7: 269–276.
- Bok E.W.A., Mazurek J., Pusz P., Stosik M. 2013. Age as a factor influencing diversity of commensal *E. coli* microflora in pigs. *Pol. J. Microbiol.* 62:165–171.
- Bok E., Mazurek J., Stosik M., Wojciech M., Baldy-Chudzik 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.* 12:970–985.

-  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. 54:1171–1182.
-  Boma M.H., Bilkei G. 2006. Gross pathological findings in sows of different parity, culled due to recurring swine urogenital disease (SUGD) in Kenya. Onderstepoort J. Vet. Res. 73, 139–142.
-  Bonacorsi S., Bingen E. 2005. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* causing neonatal meningitis. Int J Med Microbiol. 295:373–81.
-  Borges S., Barbosa J., Silva J., Teixeira P. 2013. Evaluation of characteristics of *Pediococcus* spp. to be used as a vaginal probiotic. J Appl Microbiol. 115(2):527-538.
-  Branco K.M.G.R., Nardi R.M.D., Moreira J.L.S., Nunes A.C., Farias L.M., Nicoli J.R., Carvalho M.A. 2010. Identification and in vitro production of *Lactobacillus* antagonists from women with or without bacterial vaginosis. Brazilian J Med Biol Res. 43: 338–344.
-  Brumbaugh A.R., Smith S.N., Subashchandrabose S., Himpsl S.D., Hazen T.H., Rasko D.A., Mobley H.L.T. 2015. Blocking yersiniabactin import attenuates extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in cystitis and pyelonephritis and represents a novel target to prevent urinary tract infection. Infect Immun. 83:1443–1450.
-  Buddington R.K., Williams C.H., Kostek B.M., Buddington K.K., Kullen M.J. 2010. Maternal-to-infant transmission of probiotics: concept validation in mice, rats, and pigs. Neonatology. 97(3):250-256.
-  Burgess S.A., Lindsay D., Flint S.H. 2010. Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. Int J Food Microbiol. 144:215–225.
-  Burton E.N., Cohn L.A., Reinero C.N., Rindt H., Moore S.G., Ericsson A.C. 2017. Characterization of the urinary microbiome in healthy dogs. PLoS ONE 12(5): e0177783.
-  Callens B., Faes C., Maes D., Catry B., Boyen F., Francoys D., de Jong E., Haesebrouck F., Dewulf J. 2015. Presence of antimicrobial resistance and antimicrobial use in sows are risk factors for antimicrobial resistance in their offspring. Microb. Drug Resist. 21: 50–58.
-  Calzada J., Di yenko F., Frattini C. 2018. Radiografía de la producción de cerdos en Argentina. Boletín AÑO XXXVI – N° 1860, Junio de 2018. Informativo Semanal de la Bolsa de Comercio de Rosario. [https://www.bcr.com.ar/Publicaciones/Informativo%20semanal/bcr2018\\_06\\_01.pdf](https://www.bcr.com.ar/Publicaciones/Informativo%20semanal/bcr2018_06_01.pdf)
-  Cavicchioli V.Q., Camargo A.C., Todorov S.D., Nero L.A. 2017. Novel bacteriocinogenic *Enterococcus hirae* and *Pediococcus pentosaceus* strains with antilisterial activity isolated from Brazilian artisanal cheese. J Dairy Sci 100(4):2526–2535.
-  Changkaew K., Intarapuk A., Utrarachkij F., Nakajima C., Suthienkul O., Suzuki, Y. 2015. Antimicrobial resistance, extended-spectrum  $\beta$ -lactamase productivity, and class 1 integrons in *Escherichia coli* from healthy swine. J Food Prot 78: 1442–1450.
-  Chapman M.R., Robinson L.S., Pinkner J.S., Roth R., Heuser J., Hammar M., Normark S., Hultgren S.J. 2002. Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. Science. 295: 851–855.
-  Chaturvedi K.S., Hung C.S., Crowley J.R., Stapleton A.E., Henderson J.P. 2012. The siderophore yersiniabactin binds copper to protect pathogens during infection. Nat Chem Biol. 8:731–736.
-  Chee-Sanford J.C., Mackie R.I., Koike S., Krapac I.G., Lin Y.F., Yannarell A.C., Maxwell S., Aminov R.I. 2009. Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genes following land application of manure waste. J. Environ. Qual. 38:1086–1108.
-  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., Christenson J.K., Denamur E., Gordon D.M. 2013. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. Environ Microbiol Rep. 5(1):58-65.
-  Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2012. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-second informational supplement. M100-S22 CLSI, Wayne, PA.

- Cole J.R., Wang Q., Cardenas E., Fish J., Chai B., Farris R.J., Kulam-Syed-Mohideen A.S., McGarrell D.M., Marsh T., Garrity G.M., Tiedje J.M. 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 37(Database issue):D141-145.
- Collins J.W., La Ragione R.M., Woodward M.J., Searle L.E.J. 2009. Application of prebiotics and probiotics in livestock en “Prebiotics and Probiotics Science and Technology”. Editado por D. Charalampopoulos, R.A Rastall. Springer Science & Business Media. New York pp 1123–1192.
- Cora M.C., Kooistra L., Travlos G. 2015. Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse: review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears. *Toxicol Pathol.* 43(6):776-793.
- Cotter P.D., Ross R.P., Hill, C. 2013. Bacteriocins-a viable alternative to antibiotics? *Nat. Rev. Microbiol.* 11: 95–105.
- Crépin S., Houle S., Charbonneau M.E., Mourez M., Harel J., Dozois C.M. 2012. Decreased expression of type 1 fimbriae by a pst mutant of uropathogenic *Escherichia coli* reduces urinary tract infection. *Infect Immun.* 80(8):2802-2815.
- Das S., Dash H.R., Mangwani N., Chakraborty J., Kumari S. 2014. Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. *J Microbiol Methods.* 103:80-100.
- Dänicke S., Döll S. 2010. A probiotic feed additive containing spores of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* does not prevent absorption and toxic effects of the Fusarium toxin deoxynivalenol in piglets. *Food Chem Toxicol.* 48(1):152-158.
- de Jong A., Smet, A., Ludwig C., Stephan B., De Graef E., Vanrobaeys M. Haesebrouck F. 2014. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolates from healthy pigs and chickens (2008-2011). *Vet Microbiol* 171, 298–306.
- DebRoy C., Roberts E., Scheuchenzuber W., Kariyawasam S., Jayarao B.M. 2009. Comparison of genotypes of *Escherichia coli* strains carrying F18ab and F18ac fimbriae from pigs. *J Vet Diagn Invest* 21:359–364.
- De Kwaadsteniet M., Todorov S., Knoetze H., Dicks, L. 2005. Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 105: 433–444.
- De Man J. C., Rogosa M., Sharpe M. E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J Appl Bacteriol.* 23:130-135.
- De Paz Véliz E.R. 2012. Cistitis y pielonefritis, causa importante de mortalidad en cerdas gestantes. <https://www.engormix.com/porcicultura/foros/cistitis-pielonefritis-causa-importante-t2815/>
- de Oliveira Lima D.N. 2012. Atlas de citopatologia ginecológica. Ministério da Saúde Brasília. CEPESC. ISBN 978-85-324-0031-4.
- de Winter P.J.J.; Verdonck M., de Kruif A., Devriese L.A., Haesebrouck F. 1995. Bacterial endometritis and vaginal discharge in the sow: prevalence of different bacterial species and experimental reproduction of the syndrome. *Anim Reprod Sci.* 37(3-4):325-335.
- Dicks L.M.T., Heunis T.D.J., Staden D.A., Brand A., Noll K.S., Chikindas M.L. 2011. Medical and personal care applications of bacteriocins produced by lactic acid bacteria en “Prokaryotic Antimicrobial Peptides”. Editado por: D. Drider, S. Rebuffat. Springer. New York. pp 391–421.
- Directiva del Consejo Europeo 90/429/CEE. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX%3A32012R0176>
- Dixit S.M., Gordon D.M., Wu X.Y., Chapman T., Kailasapathy K., Chin J.J. 2004. Diversity analysis of commensal porcine *Escherichia coli* –associations between genotypes and habitat in the porcine gastrointestinal tract. *Microbiology.* 150:1735–1740.
- Drolet R. 2012. Urinary System en “Diseases of Swine”. Editado por J.J. Zimmerman, L.A. Karriker, A. Ramirez, K.J. Schwartz, G.W. Stevenson. John Wiley & Sons, Inc., Iowa, pp. 363-379.
- Dubreuil J.D., Isaacson R.E., Schifferli D.M. 2016. Animal Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *EcoSal Plus.* 7(1):10.1128/ecosalplus.ESP-0006-2016.
- EFSA 2008. European Food Safety Authority. Report from the task force on zoonoses data collection including guidance for harmonized monitoring and reporting of antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. from food animals. *EFSA J.* 141:1–44.



-  EFSA Panel on Biological Hazards. 2017. Scientific Opinion on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA. EFSA J.15:e04664. doi:10.2903/j.efsa.2017.4664. (<https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/qps>).
-  Eschenbach D.A., Davick P.R., Williams B.L., Klebanoff S.J., Young-Smith K., Critchlow C.M., Holmes K.K. 1989. Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. J Clin Microbiol. 27(2):251-256.
-  Escobar-Páramo P., Le Menac'h A., Le Gall T., Amorin C., Gouriou S., Picard B., Skurnik D., Denamur E. 2006. Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. Environ Microbiol. 8(11):1975-1984.
-  Fairbrother J.M., Gyles C.L. 2012. Colibacillosis en "Diseases of Swine". Editado por J.J. Zimmerman, L.A. Karriker, A. Ramirez, K.J. Schwartz, G.W. Stevenson. John Wiley & Sons, Inc., Iowa, pp. 723–749.
-  Falceto M.V., Stevenson A. Calavia M. Gómez A. 2012. Lactación y etiología del síndrome de disgalaxia posparto de la cerda. Suis. 86:14-22.
-  Fangman T.J., Amass S.F. 2007. Postpartum care of the sow and neonates en "Current therapy in large animal". Editado por R.S. Youngquist, W.R. Threlfall. Saunders Elsevier Inc., Missouri, pp.784-788.
-  Fangman T.J., Carlson Shannon M. 2007. Diseases of the puerperal period en "Current therapy in large animal". Editado por R.S. Youngquist, W.R. Threlfall. Saunders Elsevier Inc., Missouri, pp. 789-796.
-  FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organisation) 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. pp. 1–33.
-  Fernández Algarra C. 2010. Aparato reproductor en "Casos clínicos de citología en el perro y el gato". Servet. Zaragoza – España. ISBN: 978-84-92569-37-3.
-  Flores-Mireles A.L., Walker J.N., Caparon M., Hultgren S.J. 2015. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. Nat. Rev. Microbiol. 13: 269–284.
-  Floss J.L., Tubbs, R.C. 1993. Infectious causes of infertility in sows. .University of Missouri. Extension. <https://extension2.missouri.edu/g2315>
-  Foisnet A., Farmer C., David C., Quesnel H. 2010. Relationships between colostrum production by primiparous sows and sow physiology around parturition. J Anim Sci. 88:1672–1683.
-  Fontana C., Bassi D., López C., Pisacane V., Otero M.C., Puglisi E., Rebecchi A., Cocconcelli P.S., Vignolo G. 2016. Microbial ecology involved in the ripening of naturally fermented llama meat sausages. A focus on lactobacilli diversity. Int J Food Microbiol. 236:17-25.
-  Fontana C., Cappa F., Rebecchi A., Cocconcelli P.S. 2010. Surface microbiota analysis of Taleggio, Gorgonzola, Casera, Scimudin and Formaggio di Fossa Italian cheeses. Int J Food Microbiol. 138(3):205-11
-  Fontana C., Cocconcelli P.S., Vignolo G. 2005. Monitoring the bacterial population dynamics during fermentation of artisanal Argentinean sausages. Int J Food Microbiol. 103(2):131-42.
-  Franck S.M., Bosworth B.T., Moon H.W. 1998. Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves. J. Clin. Microbiol. 36: 1795–1797.
-  Franz C.M.A.P., Huch M., Abriouel H., Holzapfel W., Gálvez A. 2011. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. Int. J. Food Microbiol. 151:125–140.
-  Freitas A.C., Chaban B., Bocking A., Rocco M., Yang S., Hill J.E., Money D.M. 2017. The vaginal microbiome of pregnant women is less rich and diverse, with lower prevalence of Mollicutes, compared to non-pregnant women. Sci Rep. 7(1):9212.
-  Funkhouser L.J., Bordenstein S.R. 2013. Mom knows best: the universality of maternal microbial transmission. PLOS Biology. 11(8): e1001631.
-  Fusco V., Quero G.M., Cho G.S., Kabisch J., Meske D., Neve H., Bockelmann W., Franz C.M.A.P. 2015. The genus Weissella: taxonomy, ecology and biotechnological potential. Front Microbiol. 6:155.

- Gajer P., Brotman R.M., Bai G., Sakamoto J., Schütte U.M., Zhong X., Koenig S.S., Fu L., Ma Z.S., Zhou X., Abdo Z., Forney L.J., Ravel J. 2012. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Sci Transl Med.* 4(132):132ra52.
- 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(4):625-37.
- Genís S., Cerri R.L.A., Bach À., Silper B.F., Baylão M., Denis-Robichaud J., Arís A. 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.* 5:135.
- Gerjets I., Kemper N. 2009. Coliform mastitis in sows: a review. *Swine Health Prod.* 17:97–105.
- Gerjets I., Traulsen I., Reiners K., Kemper N. 2011. Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* isolates from sows with coliform mastitis and healthy sows. *Vet Microbiol.* 152(3-4):361-367.
- Germon P., Chen Y.H., He L., Blanco J.E., Brée A., Schouler C., Huang S.H., Moulin-Schouleur M. 2005. *ibeA*, a virulence factor of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology.* 151(Pt 4):1179-1186.
- Gibbons J.F., Boland F., Buckley J.F., Butler F., Egan J., Fanning S., Markey B.K., Leonard F.C. 2014. Patterns of antimicrobial resistance in pathogenic *Escherichia coli* isolates from cases of calf enteritis during the spring-calving season. *Vet Microbiol.* 170: 73–80.
- Gibson G.R., Hutkins R.W., Sanders M.E., Prescott S.L., Reimer R.A., Salminen S.J. Scott K., Stanton C., Swanson K.S., Cani P.D., Verbeke K., Reid G. 2017. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat Rev. Gastroenterol Hepatol.* 14(8):491-502.
- Giroto A.F., Sobestiansky J., Dalla Costa O.A., Matos M.P.C., Pôrto R.N.G. 2000. Avaliação econômica de alta prevalência de infecção urinária em matrizes em um sistema intensivo de produção de suínos., Embrapa-CNPQA, Comun. Téc.59.
- Gonzalez Moreno C., Fontana C., Cocconcelli P.S., Callegari M.L., Otero M.C., 2016. Vaginal microbial communities from synchronized heifers and cows with reproductive disorders, *J. Appl. Microbiol.* 121: 1232–1241.
- Gottschalk M. 2012. Streptococcosis en “Diseases of Swine”. Editado por J.J. Zimmerman, L.A. Karriker, A. Ramirez, K.J. Schwartz, G.W. Stevenson. John Wiley & Sons, Inc., Iowa, pp.841-855.
- Gottschick C., Deng Z.L., Vital M., Masur C., Abels C., Pieper D.H., Wagner-Döbler I. 2017. The urinary microbiota of men and women and its changes in women during bacterial vaginosis and antibiotic treatment. *Microbiome.* 5(1):99.
- Gurjar M. 2015. Colistin for lung infection: an update. *J. Intensive Care.* 3:1–12.
- Gupta A., Tiwari S.K. 2015. Probiotic potential of bacteriocin producing *Enterococcus hirae* strain LD3 isolated from dosa batter. *Ann Microbiol.* 65:2333–2342.
- Gupta A., Tiwari S.K., Netrebov V., Chikindas M.L. 2016. Biochemical properties and mechanism of action of enterocin LD3 purified from *Enterococcus hirae* LD3 Probiotics Antimicrob Proteins. 8(3):161-169.
- Gusmara C., Andreoni S., Barzetti C., Sala V. 2011. Osservazioni diagnostiche sulle infezioni urinarie (UTI) della scrofa. *Large Anim Rev.* 17: 247-251.
- Gyles C.L., Fairbrother J.M., 2010. *Escherichia coli* en “Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals”. Editado por: C.L. Gyles, J.F. Prescott, J.G. Songer, C.O. Thoen. Blackwell Publishing, Iowa. pp. 267–308.
- Hammami R., Fernandez B., Lacroix C., Fliss I. 2013. Anti-infective properties of bacteriocins: an update. *Cell. Mol. Life Sci.* 70:2947–2967.
- Hammerum A.M., Heuer O.E. 2009. Human health hazards from antimicrobial resistant *Escherichia coli* of animal origin. *Clin Infect Dis* 48: 916–921.
- Hanchi H., Hammami R., Fernandez B., Kourda R., Ben Hamida J., Fliss I. 2016. Simultaneous production of formylated and nonformylated enterocins L50A and L50B as well as 61A, a new glycosylated Durancin, by *Enterococcus durans* 61A, a strain isolated from artisanal fermented milk in Tunisia. *J. Agric.Food Chem.* 64: 3584–3590.

- Hanchi H., Mottawea W., Sebei K., Hammami R. 2018. The genus *Enterococcus*: between probiotic potential and safety concerns—An update. *Front. Microbiol.* 9:1791.
- Hancock V., Nielsen E.M., Krag L., Engberg J., Klemm P. 2009. Comparative analysis of antibiotic resistance and phylogenetic group patterns in human and porcine urinary tract infectious *Escherichia coli*. *APMIS* 117: 786–790.
- Hannan T.J., Totsika M., Mansfield K.J., Moore K.H., Schembri M.A., Hultgren S.J. 2012. Host-pathogen checkpoints and population bottlenecks in persistent and intracellular uropathogenic *Escherichia coli* bladder infection. *FEMS Microbiol. Rev.* 36:616–648.
- Hayakawa T., Masuda T., Kurosawa D., Tsukahara T. 2016. Dietary administration of probiotics to sows and/or their neonates improves the reproductive performance, incidence of post-weaning diarrhea and histopathological parameters in the intestine of weaned piglets. *Anim Sci J.* 87(12):1501-1510.
- Henderson J.P., Crowley J.R., Pinkner J.S., Walker J.N., Tsukayama P., Stamm W.E., Hooton T.M., Hultgren S.J. 2009. Quantitative metabolomics reveals an epigenetic blueprint for iron acquisition in uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS Pathog* 5:e1000305.
- Heras J., Domínguez C., Mata E., Pascual V., Lozano C., Torres C., Zarazaga M. 2015. GelJ-a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. *BMC Bioinformatics*.16:270.
- Herath S., Lilly T., Fischer D., Williams E., Dobson H., Bryant C., Sheldon M. 2009. Bacterial lipopolysaccharide induces an endocrine switch from prostaglandin F2 alpha to prostaglandin E2 in bovine endometrium. *Endocrinology.* 150(4): 1912–1920.
- Heuer H., Schmitt H., Smalla K. 2011. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Curr. Opin. Microbiol.* 14:236–243.
- Hilt E.E., McKinley K., Pearce M.M., Rosenfeld A.B., Zilliox M.J., Mueller E.R., Brubaker L., Gai X., Wolfe A.J., Schreckenberger P.C. 2014. Urine is not sterile: use of enhanced urine culture techniques to detect resident bacterial flora in the adult female bladder. *J Clin Microbiol.* 52:871–876.
- Horakova K., Mlejnkova H., Mlejnek P. 2008. Specific detection of *Escherichia coli* isolated from water samples using polymerase chain reaction targeting four genes: cytochrome bd complex, lactose permease,  $\beta$ -D-glucuronidase, and  $\beta$ -D-galactosidase. *J. Appl. Microbiol.* 105:970–976.
- Hu C., Song J., You Z., Luan Z., Li W. 2012. Zinc Oxide-Montmorillonite hybrid influences diarrhea, intestinal mucosal integrity, and digestive enzyme activity in weaned pigs. *Biol Trace Elem Res.*149:190-196.
- Hufnagel D.A., DePas W.H., Chapman M.R. 2015. The biology of the *Escherichia coli* extracellular matrix. *Microbiol Spectr.* 3(3):10.1128.
- Hung C., Zhou Y., Pinkner J.S., Dodson K.W., Crowley J.R., Heuser J., Chapman M.R., Hadjifrangiskou M., Henderson J.P., Hultgren S.J. 2013. *Escherichia coli* biofilms have an organized and complex extracellular matrix structure. *mBio* 4(5):e00645-13.
- Hussain A., Ewers C., Nandanwar N., Guenther S., Jadhav S., Wieler L.H., Ahmed N. 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.
- Hutchins R.G., Vaden S.L., Jacob M.E., Harris T.L., Bowles K.D., Wood M.W., Bailey C.S. 2014. Vaginal microbiota of spayed dogs with or without recurrent urinary tract infections. *J Vet Intern Med.* 28(2):300-304.
- Huys G., Botteldoorn N., Delvigne F., De Vuyst L., Heyndrickx M., Pot B., Dubois J.J., Daube G. 2013. Microbial characterization of probiotics—advisory report of the working group “8651 probiotics” of the Belgian superior health council (SHC). *Mol. Nutr. Food Res.* 57:1479–1504.
- Informe INTA-IDEP 2013. Caracterización del sector porcino en la provincia de Tucumán, Informe en conjunto del Instituto de desarrollo productivo de Tucumán (IDEP) y el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. <http://idep.gov.ar/estadisticas/904/el-idep-tucuman-y-el-inta-realizaron-un-informe-para-caracterizar-al-sector-porcino>.

- Isling L.K., Aalbaek B., Schrøder M., Leifsson P.S. 2010. Pyelonephritis in slaughter pigs and sows: morphological characterization and aspects of pathogenesis and aetiology. *Acta Vet Scand.* 52:48.
- Jabif M.F. 2013. Fallas reproductivas: Herramientas de diagnóstico y control. Informe de actualización técnica N° 28 Vetanco. Fericerdo 2013. <https://www.engormix.com/porcicultura/articulos/fallas-reproductivas-herramientas-diagnostico-t30403.htm>.
- Jacobsen S.M., Stickler D.J., Mobley H.L., Shirtliff M.E. 2008. Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clin Microbiol Rev.* 21(1):26-59.
- Jadhav S., Hussai A., Devi S., Kumar A., Parveen S., Gandham N., Wieler L.H., Ewers C., Ahmed N. 2011. Virulence characteristics and genetic affinities of multiple drug resistant uropathogenic *Escherichia coli* from a semi urban locality in India. *PLoS One.* 6(3):e18063.
- Jain S., Chen J. 2007. Attachment and biofilm formation by various serotypes of *Salmonella* as influenced by cellulose production and thin aggregative fimbriae biosynthesis. *J Food Prot.* 70(11):2473-2479.
- Jana B., Kucharski J., Dzienis A., Deptuła K. 2007. Changes in prostaglandin production and ovarian function in gilts during endometritis induced by *Escherichia coli* infection. *Anim Reprod Sci.* 97(1-2):137-50.
- Jiang Z., Wei S., Wang Z., Zhu C., Hu S., Zheng C., Chen Z., Hu Y., Wang L., Ma X., Yang X. 2015. Effects of different forms of yeast *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance, intestinal development, and systemic immunity in early-weaned piglets. *J Anim Sci Biotechnol.* 6: 47-54.
- Johnson L.A., Weitze K.F., Fiser P., Maxwell W.M. 2000. Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci.* 62(1-3):143-172.
- Johnson J.R., Stell A.L. 2000. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise, *J. Infect. Dis.* 181: 261e72.
- Johnson T.J., Wannemuehler Y., Johnson S.J., Stell A.L., Doetkott C., Johnson J.R., Kim K.S., Spanjaard L., Nolan L.K., 2008. Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:7043-7050.
- Juturu V., Wu J.C. 2018. Microbial production of bacteriocins: Latest research development and applications. *Biotechnol Adv.* 36(8):2187-2200.
- Kaesbohrer A., Schroeter A., Tenhagen B.A., Alt K., Guerra B., Appel B. 2012. Emerging antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* with public health relevance, *Zoonoses Public Health.* 59:158-165.
- Kaper J.B., Nataro J.P., Mobley H.L.T., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:123-140.
- Kasimanickam R., Duffield T.F., Foster R.A., Gartley C.J., Leslie K.E., Walton J.S., Johnson W.H. 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.
- Kemper N., Bardehle D., Lehmann J., Gerjets I., Looft H., Preissler R. 2013. The role of bacterial pathogens in coliform mastitis in sows. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 126(3-4):130-136.
- Kenny M., Smidt H., Mengheri E., Miller B. 2011. Probiotics – do they have a role in the pig industry? *Animal.* 5(3):462-470.
- Klemm P., Schembri M. A. 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.
- Kimouli M., Vrioni G., Papadopoulou M., Koumaki V., Petropoulou D., Gounaris A., Friedrich A.W., Tsakris A. 2012. Two cases of severe sepsis caused by *Bacillus pumilus* in neonatal infants. *J Med Microbiol.* 61(Pt 4):596-599.
- Kirkwood R.N., Althouse G.C., Yaeger M.J., Carr J., Almond G.W. 2012. Diseases of the Reproductive System en “Diseases of Swine”. Editado por J.J. Zimmerman, L.A. Karriker, A. Ramirez, K.J. Schwartz, G.W. Stevenson. John Wiley & Sons, Inc., Iowa. pp 329-347.




















- Klopfenstein C., Farmer C., Martineau G.P. 2006. Mammary glands and lactation problems en "Diseases of Swine". Editado por BE Straw, WL Mengeling, S D'Allaire, DJ Taylor. University Press. Iowa. pp. 833–860.
- Kogan G., Kocher A. 2007. Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. *Livest Sci.* 109:161-165.
- Köhler C.D., Dobrindt U. 2011. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? *Int J Med Microbiol.* 301(8):642-647.
- Koketsu Y., Tani S., Iida R. 2017. Factors for improving reproductive performance of sows and herd productivity in commercial breeding herds. *Porcine Health Manag.* 3:1.
- Konstantinov S.R., Smidt H., Akkermans A.D., Casini L., Trevisi P., Mazzoni M., De Filippi S., Bosi P., de Vos W.M. 2008. Feeding of *Lactobacillus sobrius* reduces *Escherichia coli* F4 levels in the gut and promotes growth of infected piglets. *FEMS Microbiol Ecol.* 6(3):599-607.
- Korea C.G., Ghigo J.M., Beloin C. 2011. The sweet connection: Solving the riddle of multiple sugar-binding fimbrial adhesins in *Escherichia coli*: Multiple *E. coli* fimbriae form a versatile arsenal of sugar-binding lectins potentially involved in surface-colonisation and tissue tropism. *Bioessays.* 33(4):300-311.
- Kostakioti M., Hadjifrangiskou M., Hultgren S.J. 2013. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 3(4):a010306.
- Krag L., Hancock V., Aalbæk B., Klemm P. 2009. Genotypic and phenotypic characterisation of *Escherichia coli* strains associated with porcine pyelonephritis. *Vet Microbiol.* 134:318–326.
- Kritas S.K., Marubashi T., Filioussis G., Petridou E., Christodouloupoulos G., Burriel A.R., Tzivara A., Theodoridis A., Pískoriková M. 2015. Reproductive performance of sows was improved by administration of a sporing bacillary probiotic (*Bacillus subtilis* C-3102). *J Anim Sci.* 93(1):405-413.
- Kuberka L. 2018. Year of the Pig Comes Early: Record Pork Supplies on World Market en *Livestock and Poultry: World Markets and Trade*. United States Department of Agriculture Foreign Agricultural Service (USDA) April 10, 2018. <http://usda.mannlib.cornell.edu/MannUsda/viewDocumentInfo.do?documentID=1488>.
- Lane M.C., Mobley H.L. 2007. Role of P-fimbrial-mediated adherence in pyelonephritis and persistence of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in the mammalian kidney. *Kidney Int.* 72(1):19-25.
- Lay K.K., Koowattananukul C., Chansong N., Chuanchuen R. 2012. Antimicrobial resistance, virulence, and phylogenetic characteristics of *Escherichia coli* isolates from clinically healthy swine, *Foodborne Pathog. Dis.* 9:992–1001.
- Lazarevic M., Milovanovic A., Barna T., Miljas N., Milanov D. 2012. Endometritis therapy in sows by intra uterine instillation of yeast cell wall solution. *Acta Vet (Beogr).* 62(5-6):611-626.
- Lebreton F., Willems R.J.L., Gilmore M.S. 2014. Enterococcus diversity, origins in nature, and gut colonization en "Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection". Editado por M.S. Gilmore, D.B. Clewel, Y. Ike, N. Shanker. Massachusetts Eye and Ear Infirmary; Boston. pp. 5–64.
- Leuschner R.G., Bew J., Cruz A., Adler A., Auclair E., Bertin G., Braconnier M., Domig K., Jones P., Kneifel W., Krause M., Marmo S., Michard J., Mietke H., O'Briain A., Olofson A.S., Ruppsch W., Thalmann A., Voets A., Warmerdam C. 2003. Enumeration of probiotic bacilli spores in animal feed: interlaboratory study. *J AOAC Int.* 86(3):568-575.
- Lewus C., Montville T. 1991. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *J. Microbiol. Methods.* 13(2):145-150.
- Liao S.F., Nyachoti M. 2017. Using probiotics to improve swine gut health and nutrient utilization. *Anim Nutr.* 3(4):331-343.
- Limoli D.H., Jones C.J., Wozniak D.J. 2015. Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function. *Microbiol Spectr.* 3(3):10. doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0011-2014.
- Liu Y., Song M., Che T.M., Almeida J.A., Lee J.J., Bravo D., Maddox C.W., Pettigrew J.E. 2013a. Dietary plant extracts alleviate diarrhea and alter immune responses of weaned pigs experimentally infected with a pathogenic *Escherichia coli*. *J Anim Sci.* 91:5294-5306.

- Liu Y., Che T.M., Song M., Lee J.J., Almeida J.A., Bravo D., Van Alstine W.G., Pettigrew J.E. 2013b. Dietary plant extracts improve immune responses and growth efficiency of pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Anim Sci.* 91:5668-5679.
- Liu Y.Y., Wang Y., Walsh T.R., Yi L.X., Zhang R., Spencer, J., Doi Y., Tian G., Dong B., Huang X., Yu L.F., Gu D., Ren H., Chen X., Lv L., He D., Zhou H., Liang Z., Liu J.H., Shen J. 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect. Dis.* 16:161–168.
- Liu Y., Espinosa C.D., Abelilla J.J., Casas G.A., Lagos L.V., Lee S.A., Kwon W.B., Mathai J.K., Navarro D.M.D.L, Jaworski N.W., Stein H.H. 2018. Non-antibiotic feed additives in diets for pigs: A review. *Anim Nutr.* 4(2):113-125.
- Livestock and Poultry: World Markets and Trade. Foreign Agricultural Service United States Department of Agriculture (USDA) April 10, 2018. <http://usda.mannlib.cornell.edu/MannUsda/viewDocumentInfo.do?documentID=1488>.
- Lorenzen E., Follmann F., Jungersen G., Agerholm J.S. 2015a. A review of the human vs. porcine female genital tract and associated immune system in the perspective of using minipigs as a model of human genital Chlamydia infection. *Vet Res.* 46:116.
- Lorenzen E., Kudirkienė E., Gutman N., Grossi A.B., Agerholm J.S., Erneholm K., Skytte C., Dalgaard M.D., Bojesen A.M. 2015b. The vaginal microbiome is stable in prepubertal and sexually mature Ellegaard Göttingen Minipigs throughout an estrous cycle. *Vet Res.* 46:125.
- Luppi A., Gibellini M., Gin T., Vangroenweghe F., Vandenbroucke V., Bauerfeind R., Bonilauri P., Labarque G., Hidalgo Á. 2016. Prevalence of virulence factors in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhoea in Europe. *Porcine Health Manag.* 2:20. doi: 10.1186/s40813-016-0039-9.
- Ma Q., Wood T.K. 2009. OmpA influences *Escherichia coli* biofilm formation by repressing cellulose production through the CpxRA two-component system. *Environ Microbiol.* 11(10):2735-2746.
- Ma Y.L., Zanton G.I., Zhao J., Wedekind K., Escobar J., Vazquez-Anon M. 2015. Multitrial analysis of the effects of copper level and source on performance in nursery pigs. *J Anim Sci.* 93:606-614.
- Macedo R. 2017. Cría porcina a campo para pequeños Productores familiares de Tucumán. Proyecto Regional con Enfoque Territorial Tucumán Sur. Ediciones INTA.
- Mainil J. 1999. Shiga/verocytotoxins and Shiga/verotoxigenic *Escherichia coli* in animals. *Vet Res* 30:235–257.
- Malinowski E., Lassa H., Markiewicz, H., Kaptur M., Nadolny M., Niewitecki W., Zie J. 2011. Sensitivity to antibiotics of *Arcanobacterium pyogenes* and *Escherichia coli* from the uteri of cows with metritis/endometritis, *Vet. J.* 187:234–238.
- McDougall S., Hussein H., Aberdein D., Buckle K., Roche J., Burke C., Mitchell M., Meier S. 2011. Relationships between cytology, bacteriology and vaginal discharge scores and reproductive performance in dairy cattle. *Theriogenology.* 76(2):229-240.
- Maes D., Verdonck M., De Kruif A. 1999. Vaginal microecology and vulval discharge in swine, in: P.J. Heidt, P.B. Carter, V. Rusch, D. van der Waaij (Eds.), Old Herborn University Seminar Monograph 12: Vaginal flora in health and disease, Herborn Litterae, Herborn-Dill. pp. 39–50.
- Marchant E.A., Boyce G.K., Sadarangani M., Lavoie P.M. 2013. Neonatal sepsis due to coagulase-negative staphylococci. *Clin Dev Immunol.* 2013:1-10.
- Marcus S., Menda A., Shore L., Cohen G., Atweh E., Friedman N., Karpas Z. 2012. A novel method for the diagnosis of bacterial contamination in the anterior vagina of sows based on measurement of biogenic amines by ion mobility spectrometry: A field trial. *Theriogenology.* 78:753-758.
- Maron D.F., Smith T.J.S., Nachman K.E. 2013. Restrictions on antimicrobial use in food animal production: an international regulatory and economic survey. *Global Health* 9: 48.
- Martineau G.P., Farmer C., Peltoniemi O. 2012. Mammary System en “Diseases of Swine”. Editado por J.J. Zimmerman, L.A. Karriker, A. Ramirez, K.J. Schwartz, G.W. Stevenson. John Wiley & Sons, Inc., Iowa. pp 270-293.

- Martinez J.J., Mulvey M.A., Schilling J.D., Pinkner J.S., Hultgren S.J. 2000. Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *EMBO J.* 19:2803–2812.
- Martín R., Delgado S., Maldonado A., Jiménez E., Olivares M., Fernández L., Sobrino O.J., Rodríguez J.M. 2009. Isolation of lactobacilli from sow milk and evaluation of their probiotic potential. *J Dairy Res.* 76(4):418-425.
- Matsumoto A., Yamagishi Y., Miyamoto K., Oka K., Takahashi M., Mikamo H. 2018. Characterization of the vaginal microbiota of Japanese women. *Anaerobe.* 54:172-177.
- Maurer J.J., Brown T.P., Steffens W.L., Thayer S.G. 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., Bok E., Baldy-Chudzik K. 2018. Complexity of antibiotic resistance in commensal *Escherichia coli* derived from pigs from an intensive-production farm. *Microbes Environ.* 33(3): 242-248.
- Mazutti K., Locatelli-Dittrich R., Lunardon I., Kuchiishi S.S., Lara A.C., Zotti E., Montiani-Ferreira F., Alberton G., C.2013. Evaluation of the reagent test strips and microscopic examination of urine in the diagnosis of urinary tract infection in sows. *Pesq. Vet. Bras.* 33(9):1103-1108.
- McLean A. C., Valenzuela N., Fai S., Bennett S. A. L. 2012. Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *J. Vis. Exp.* 67: e4389.
- Menin A., Reck C., Capelli J.C., Ferraz S.N., Vaz E.K. 2008. Diagnóstico de infecção urinária em fêmeas suínas produtivas em granjas comerciais no sul do Brasil. *Ciênc. Anim. Bras.* 9:199-206.
- Miller E.A., Livermore J.A., Alberts S.C., Tung J., Archie E.A. 2017. Ovarian cycling and reproductive state shape the vaginal microbiota in wild baboons. *Microbiome.* 5(1):8. doi: 10.1186/s40168-017-0228-z.
- Mohania D., Nagpal R., Kumar M., Bhardwaj A., Yadav M., Jain S., Marotta F., Singh V., Parkash O., Yadav H. 2008. Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. *J Dig Dis.* 9(4):190-198.
- Mohapatra B.R., Broersma K., Mazumder A. 2007. Comparison of five rep-PCR genomic fingerprinting methods for differentiation of fecal *Escherichia coli* from humans, poultry and wild birds. *FEMS Microbiol Lett.* 277(1):98-106.
- Moreno L.Z., Matajira C.E.C., Poor A.P., Mesquita R.E., Gomes V.T.M., Silva A.P.S., Amigo C.R., Christ A.P.G., Barbosa M.R.F., Sato M.I.Z., Moreno A.M. 2017. Identification through MALDI-TOF mass spectrometry and antimicrobial susceptibility profiling of bacterial pathogens isolated from sow urinary tract infection. *Vet Q.* 38(1):1-8.
- Moulin-Schouleur M., Schouler C., Tailliez P., Kao M.R., Brée A., Germon P., Oswald E., Mainil J., Blanco M., Blanco J. 2006. Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin. *J Clin Microbiol.* 44(10):3484-3492.
- Moulin-Schouleur M., Reperant M., Laurent S., Bree A., Mignon-Grasteau S., Germon P., Rasschaert D., Schouler C., 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.
- Nadaroglu H., Adiguzel A., Adiguzel G. 2015. Purification and characterization of  $\alpha$ -mannanase from *Lactobacillus plantarum* (M24) and its applications in some fruit. *Int J Food Sci Technol.* 50(5):1158–1165.
- Nagy B., Fekete P.Z. 2005. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol.* 295:443–454.
- Noguchi K., Tsukumi K., Urano T. 2003. Qualitative and quantitative differences in normal vaginal flora of conventionally reared mice, rats, hamsters, rabbits, and dogs. *Comp Med.* 53(4):404-412.
- Noguchi K., Tsukumi K., Udono T., Urano T. 2004. Normal vaginal flora in chimpanzees (Pan troglodytes): qualitative and quantitative study. *Comp Med.* 54(6):705-712.

- O'Sullivan O., O'Callaghan J., Sangrador-Vegas A., McAuliffe O., Slattery L., Kaleta P., Callanan M., Fitzgerald G.F., Ross R.P., Beresford T. 2009. Comparative genomics of lactic acid bacteria reveals a niche-specific gene set. *BMC Microbiol.* 9:50.
- Oravainen J., Heinonen M., Tast A., Virolainen J.V., Peltoniemi O.A.T. 2008. Vulvar discharge syndrome in loosely housed Finnish pigs: prevalence and evaluation of vaginoscopy, bacteriology and cytology. *Reprod Dom Anim.* 43(1):42-47.
- Otero C., Ruiz C.S., Iba R., Wilde O.R., Holgado P.D.R. 1999. Lactobacilli and enterococci isolated from the bovine vagina during the estrous cycle. *Anaerobe.* 5: 305–307.
- Otero C., Saavedra L., Silva de Ruiz C., Wilde O., Holgado A.R., Nader-Macías M.E. 2000. Vaginal bacterial microflora modifications during the growth of healthy cows. *Lett. Appl. Microbiol.* 31:251–254.
- Otero M.C., Morelli L., Nader-Macías M.E. 2006. Probiotic properties of vaginal Lactic Acid Bacteria to prevent metritis in cattle. *Lett. Appl. Microbiol.* 43:91-97.
- Papatsiros V.G., Billinis C. 2012. The prophylactic use of acidifiers as antibacterial agents in swine en “Antimicrobial agents”. Editado por V. Bobbarala. InTech, Rijeka, Croatia. pp 295-310.
- Piassa M.M.C., Merlini L.S., Martins L.A., Gonçalves D.D., Merlini N.B., Caetano I.C.S., Begotti I.L., Moraes F.F. 2015. Physical, chemical and biological aspects of the urine of sows in a certificated swine reproduction farm in the city of Toledo, Paraná, Brazil. *Afr J Microbiol Res.* 9(7):414-419.
- Pikuta E., Lysenko A., Chuvilskaya N., Mendrock U., Hippe H., Suzina N., Nikitin D., Osipov G., Laurinavichius K. 2000. *Anoxybacillus pushchinensis* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, alkaliphilic, moderately thermophilic bacterium from manure, and description of *Anoxybacillus flavitherms* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 50 Pt 6:2109-2117.
- Pôrto R.N.G., Sobestiansky J., Matos M.P.C., Meirinhos M.L.G. 2004. Aspectos histopatológicos do sistema urinário de matrizes suínas descartadas. *Ciênc. Anim. Bras.* 5(2):109-112.
- Pospiech A., Neumann B. 1995. A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. *Trends Genet.* 11(6):217-218.
- Post K.A. 2012. Overview of Bacteria en “Diseases of Swine”. Editado por J.J. Zimmerman, L.A. Karriker, A. Ramirez, K.J. Schwartz, G.W. Stevenson. John Wiley & Sons, Inc., Iowa, pp. 649–652.
- Proft T., Baker E.N. 2009. Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria – structure, assembly and their role in disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 66: 613 – 635.
- Queiroga M.C. 2018. Local and systemic humoral response to ovine mastitis caused by *Staphylococcus epidermidis*. *SAGE Open Med.* 6:2050312118801466.
- Quiles A., Hevia M.L. 2012. Control del ciclo sexual, celo y ovulación en la cerda. *Boletín de Producción Animal.* Año XXVII n°272: 46-52. <http://www.produccionanimal.com/online/272/html5/>.
- Quilodrán-Vega S.R., Villena J., Valdebenito J., Salas M.J., Parra C., Ruiz A., Kitazawa H., García A. 2016. Isolation of lactic acid bacteria from swine milk and characterization of potential probiotic strains with antagonistic effects against swine-associated gastrointestinal pathogens. *Can J Microbiol.* 62(6):514-24.
- Quintana G., Niederle M.V., Minahk C.J., Picariello G., Nader-Macías M.E.F., Pasteris S.E. 2017. Nisin Z produced by *Lactococcus lactis* from bullfrog hatchery is active against *Citrobacter freundii*, a red-leg syndrome related pathogen. *World J Microbiol Biotechnol.* 33(10):186.
- Ravel J., Gajer P., Abdo Z., Schneider G.M., Koenig S.S., McCulle S.L., Karlebach S., Gorle R., Russell J., Tacket C.O., Brotman R.M., Davis C.C., Ault K., Peralta L., Forney L.J. 2011. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108( suppl 1):4680-4687.
- Reid G. 2017. The development of probiotics for women's health. *Can. J. Microbiol.* 63: 269–277.
- Reid G., Chan R.C.Y., Bruce A.W., Costerton J.W. 1985. Prevention of urinary tract infection in rats with an indigenous *Lactobacillus casei* strain. *Infect Immun.* 49: 320–324.
- Reigstad C.S., Hultgren S.J., Gordon J.I. 2007. Functional genomic studies of uropathogenic *Escherichia coli* and host urothelial cells when intracellular bacterial communities are assembled. *J Biol Chem* 282:21259–21267.



-  Restieri C., Garriss G., Locas M.C., Dozois C.M. 2007. Autotransporter-encoding sequences are phylogenetically distributed among *Escherichia coli* clinical isolates and reference strains. *Appl Environ Microbiol.* 73(5):1553-1562.
-  Rhouma M., Beaudry F., Thériault W., Letellier A. 2016a. Colistin in pig production: chemistry, mechanism of antibacterial action, microbial resistance emergence, and one health perspectives. *Front. Microbiol.* 7:1789. doi: 10.3389/fmicb.2016.01789.
-  Rhouma M., Beaudry F., Letellier A. 2016b. Resistance to colistin: what is the fate for this antibiotic in pig production? *Int. J. Antimicrob. Agents.* 48:119–126.
-  Römer A., Wieler L.H., Schierack P. 2012. Analyses of intestinal commensal *Escherichia coli* strains from wild boars suggest adaptation to conventional pig production conditions. *Vet Microbiol.* 161(1-2):122-129.
-  Römling U., Sierralta W.D., Eriksson K., Normark S. 1998. Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. *Molecular Microbiology* 28(2):249–264.
-  Ross G.R., Gusils C., Oliszewski R., de Holgado S.C., González S.N. 2010. Effects of probiotic administration in swine. *J Biosci Bioeng.* 109(6):545-549.
-  Ruiz Rodriguez L., Vera Pingitore E., Rollan G., Cocconcelli P.S., Fontana C., Saavedra L., Vignolo G., Hebert E.M. 2016. Biodiversity and technological-functional potential of lactic acid bacteria isolated from spontaneously fermented quinoa sourdoughs. *J Appl Microbiol.* 120(5):1289-1301.
-  Rutter B., Russo A.F. 2002. El mantenimiento de la gestación en “Fundamentos de la fisiología de la gestación y el parto de los animales domésticos”. Editado por B. Rutter, A.F. Russo. Eudeba. Buenos Aires pp. 85–93.
-  Safranski T., Cox N. 2007. Clinical reproductive physiology and endocrinology of sows: mating management en “Current therapy in large animal theriogenology”. Editado por: R.S. Youngquist, W.R. Threlfall. Saunders Elsevier Inc. St. Louis. pp. 738-749.
-  Saulnier D.M., Santos F., Roos S., Mistretta T.A., Spinler J.K., Molenaar D., Teusink B., Versalovic J. 2011. Exploring metabolic pathway reconstruction and genome-wide expression profiling in *Lactobacillus reuteri* to define functional probiotic features PLoS One. 6:e18783.
-  Sarika A.R., Lipton A.P., Aishwarya M.S., Rachana Mol R.S. 2017. Lactic acid bacteria from marine fish: antimicrobial resistance and production of bacteriocin effective against *L. monocytogenes* in situ. *J Food Microbiol Saf Hyg.* 3(1): 128.
-  Sanders M.E. 2008. Probiotics: definition, sources, selection, and uses. *Clin Infect Dis.* 46 Suppl 2:S58-61; discussion S144-151.
-  Schembri M.A., Sokurenko E.V., Klemm P. 2000. Functional flexibility of the FimH adhesin: insights from a random mutant library. *Infect. Immun.* 68(5):2638-2646.
-  Schierack P., Walk N., Reiter K., Weyrauch K.D., Wieler L.H. 2007. Composition of intestinal Enterobacteriaceae populations of healthy domestic pigs. *Microbiology.* 153:3830–3837.
-  Schneeweiss J., Koch M., Umek, W. 2016. The human urinary microbiome and how it relates to urogynecology. *Int Urogynecol J.* 27:1307–1312.
-  Scientific Advisory Group on Antimicrobials of the Committee for Medicinal Products for Veterinary Use. 2009. Reflection paper on the use of third and fourth generation cephalosporins in food producing animals in the European Union: development of resistance and impact on human and animal health. *J Vet Pharmacol Ther.* 32: 515-533.
-  SENASA, 2015. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, Resolución 594/2015. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la República Argentina. <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/255000-259999/256380/norma.htm>
-  Schwarz S., Kehrenberg C., Walsh T.R. 2001. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *Int J Antimicrob Agents.* 17: 431–37.
-  Sharma P., Kaur S., Kaur R., Kaur M., Kaur S. 2018. Proteinaceous secretory metabolites of probiotic human commensal *Enterococcus hirae* 20c, *E. faecium* 12a and L12b as antiproliferative agents against cancer cell lines. *Front. Microbiol.* 9:948.

- Sheldon I.M., Cronin J., Goetze L., Donofrio G., Schuberth H.J. 2009. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biol. Reprod.* 81:1025–1032.
- Sheldon I.M., Rycroft A.N., Dogan B., Craven M., Bromfield J.J., Roberts M.H., Price S.B., Gilbert R.O., Simpson K.W. 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.
- Shen Y.B., Piao X.S., Kim S.W., Wang L., Liu P., Yoon I., Zhen Y.G. 2009. Effects of yeast culture supplementation on growth performance, intestinal health, and immune response of nursery pigs. *J Anim Sci.* 87:2614-2624.
- Sherlock O., Dobrindt U., Jensen J. B., Munk Vejborg R., Klemm P. 2006. Glycosylation of the self-recognizing *Escherichia coli* Ag43 autotransporter protein. *J. Bacteriol.* 188:1798–1807.
- Shivamurthy V.M., Gantt S., Reilly C., Tilley P., Guzman J., Tucker L. 2016. *Bacillus pumilus* septic arthritis in a healthy child. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* Article ID 3265037.
- Shokryazdan P., Faseleh Jahromi M., Liang J.B., Ho Y.W. 2017. Probiotics: from isolation to application. *J Am Coll Nutr.* 36(8):666-676.
- Shpigel N.Y., Elazar S., Rosenshine I. 2008. Mammary pathogenic *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Microbiol.* 11:60–65.
- Siddiqui H., Nederbragt A.J., Lagesen K., Jeansson S.L., Jakobsen K.S. 2011. Assessing diversity of the female urine microbiota by high throughput sequencing of 16S rDNA amplicons. *BMC Microbiol.* 11:244.
- Silva E., Leitão S., Tenreiro T., Pomba C., Nunes T., Lopes da Costa L., Mateus L. 2009. Genomic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates recovered from the uterus of puerperal dairy cows, *J. Dairy Sci.* 92:6000–6010.
- Singer R.S. 2015. Urinary tract infections attributed to diverse ExPEC strains in food animals: evidence and data gaps. *Front Microbiol.* 6:28. doi: 10.3389/fmicb.2015.00028. eCollection 2015.
- Skurnik D., Le Menac'h A., Zurakowski D., Mazel D., Courvalin P., Denamur E., Andremont A., Ruimy R. 2005. Integron-associated antibiotic resistance and phylogenetic grouping of *Escherichia Coli* isolates from healthy subjects free of recent antibiotic exposure. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:3062-3065.
- Skurnik D., Ruimy R., Andremont A., Amorin C., Rouquet P., Picard B., Denamur, E. 2006. Effect of human vicinity on antibiotic resistance and integrons in animal faecal *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 57: 1215–1219.
- Smith J.L., Fratamico P.N., Gunther N.W. 2007. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*, *Foodborne Pathog. Dis.* 4:134–165.
- Smith S.N., Hagan E.C., Lane M.C., Mobley H.L. 2010. Dissemination and systemic colonization of uropathogenic *Escherichia coli* in a murine model of bacteremia. *mBio* 1(5):e00262–10.
- Smith S.B., Ravel J. 2017. The vaginal microbiota, host defence and reproductive physiology. *J Physiol.* 595:451–463.
- Snyder J.A., Lloyd A.L., Lockett C.V., Johnson D.E., Mobley H.L. 2006. Role of phase variation of type 1 fimbriae in a uropathogenic *Escherichia coli* cystitis isolate during urinary tract infection. *Infect. Immun.* 74:1387– 1393.
- Sobestiansky J. 2007. Infecção urinária em fêmeas em produção, en “Doenças dos Suínos”. Editado por J.Sobestiansky, D.Barcellos. Cânone Editorial, Goiânia. pp 127-141.
- Soede N., Langendijk P., Kemp B. 2011. Reproductive cycles in pigs. *Anim Reprod Sci.* 124:251-8.
- Spaulding C. N., Hultgren S. J. 2016. Adhesive pili in UTI pathogenesis and drug development. *Pathogens.* 5: e30.
- Spindola M.G., Cunha M.P.V., Moreno L.Z., Amigo C.R., Silva A.P.S., Parra B.M., Poor A.P., de Oliveira C.H., Perez B.P., Knöbl T., Moreno A.M. 2018. Genetic diversity, virulence genotype and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) isolated from sows. *Vet Q.* 38(1):79-87.

- Stapleton A.E. 2016. The vaginal microbiota and urinary tract infection. *Microbiol Spectrum* 4(6): UTI-0025-2016.
- Stalder K., D'Allaire S., Drolet R., Abell C. 2012. Longevity in Breeding Animals en "Diseases of Swine". Editado por; J.J. Zimmerman, L.A. Karriker, A. Ramirez, K.J. Schwartz, G.W. Stevenson. John Wiley & Sons, Inc. Iowa. pp 50-59.
- Stepanović S., Vuković D., Hola V., Di Bonaventura G., Djukić S., Cirković I., Ruzicka F. 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*.115(8):891-9
- Strömberg N., Nyholm P. G., Pascher I., Normark, S. 1991. Saccharide orientation at the cell surface affects glycolipid receptor function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88(20):9340-9344.
- Subashchandrabose S., Mobley H.L.T. 2015. Virulence and fitness determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol Spectrum*. 3(4): UTI-0015-2012.
- Suo C., Yin Y., Wang X., Lou X., Song D., Wang X., Gu Q. 2012. Effects of *Lactobacillus plantarum* ZJ316 on pig growth and pork quality. *BMC Vet Res*. 25:88-89.
- Suskovic J., Blazenka K., Beganovic J., Pavunc A.L., Habjanic K., Matosic S. 2010. Antimicrobial activity—the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technol Biotechnol*. 48:296–307.
- Tan C., Tang X., Zhang X., Ding Y., Zhao Z., Wu B., Cai X., Liu Z., He Q., Chen H. 2012. Serotypes and virulence genes of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates from diseased pigs in China. *Vet J*. 192(3):483–488.
- Taras D., Vahjen W., Macha M., Simon O. 2006. Performance, diarrhea incidence, and occurrence of *Escherichia coli* virulence genes during long-term administration of a probiotic *Enterococcus faecium* strain to sows and piglets. *J Anim Sci*. 84: 608–617.
- Tena D., Martinez-Torres J. A., Perez-Pomata M. T., Saez-Nieto J. A., Rubio V., Bisquert, J. 2007. Cutaneous infection due to *Bacillus pumilus*: report of 3 cases. *Clin Infect Dis*. 44: e40–e42.
- Terlizzi M.E., Gribaudo G., Maffei M.E. 2017. UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) infections: virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non-antibiotic antimicrobial strategies. *Front. Microbiol*. 8:1566. doi: 10.3389/fmicb.2017.01566.
- Thomas-White K., Brady M., Wolfe A.J., Mueller E.R. 2016. The bladder is not sterile: History and current discoveries on the urinary microbiome. *Curr Bladder Dysfunct Rep*. 11(1):18-24.
- Thompson M.F., Litster A.L., Platell J.L., Trott D.J. 2011. Canine bacterial urinary tract infections: new developments in old pathogens. *Vet J*. 190(1):22-27.
- Tran T.H.T., Everaert N., Bindelle J. 2018. Review on the effects of potential prebiotics on controlling intestinal enteropathogens *Salmonella* and *Escherichia coli* in pig production. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 102(1):17-32
- Tummaruk P., Kerdangsakonwut S., Prapasarakul N., Kaeoket K. 2010. Endometritis in gilts: reproductive data, bacterial culture, histopathology, and infiltration of immune cells in the endometrium, *Comp. Clin. Pathol*. 19:575–584.
- Uhlich G.A., Cooke P.H., Solomon E.B. 2006. Analyses of the red-dry-rough phenotype of an *Escherichia coli* O157:H7 strain and its role in biofilm formation and resistance to antibacterial agents. *Appl Environ Microbiol*. 72(4):2564-72.
- Van Boeckel T.P., Brower C., Gilbert M., Grenfell B.T., Levin S.A., Robinson T.P., Teillant A., Laxminarayan R. 2015. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 112(18):5649-5654.
- Van Gelder K.N., Bilkei G. 2005. The course of acute-phase proteins and serum cortisol in mastitis -metritis–agalactia (MMA) of the sow and sow performance. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde*. 130: 38–41.
- Van Gerven N., Klein R.D., Hultgren S.J., Remaut H. 2015. Bacterial amyloid formation: structural insights into curli biogenesis. *Trends Microbiol*. 23(11):693-706.
- Vargas A.J., Bernardi M.L., Bortolozzo F.P., Mellagi A.P.G., Wentz I. 2009. Factors associated with return to estrus in first service swine females. *Preventive Veterinary Medicine*. 89:75-80.

- Ventura M., O'Flaherty S., Claesson M.J., Turrone F., Klaenhammer T.R., van Sinderen D., O'Toole P.W. 2009. Genome-scale analyses of health-promoting bacteria: probiogenomics. *Nat Rev Microbiol.* 7(1):61-71.
- Versalovic J., Koeuth T., Lupski J.R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes *Nucleic Acids Res.* 19(24):6823-31.
- Versalovic J., Schneider M., de Bruijn F.J., Lupski J.R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria with repetitive sequence based polymerase chain reaction. *Methods Mol Cell Biol* 5:25-40.
- Vila J., Sáez-López E., Johnson J.R., Römling U., Dobrindt U., Cantón R., Giske C.G., Naas T., Carattoli A., Martínez-Medina M., Bosch J., Retamar P., Rodríguez-Baño J., Baquero F., Soto S.M. 2016. *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. *FEMS Microbiol Rev.* 40(4):437-463.
- Vitali D., Wessels J.M., Kaushic C. 2017. Role of sex hormones and the vaginal microbiome in susceptibility and mucosal immunity to HIV-1 in the female genital tract. *AIDS Res Ther.* 14(1):39. doi: 10.1186/s12981-017-0169-4.
- Vo J.L., Martínez Ortiz G.C., Subedi P., Keerthikumar S., Mathivanan S., Paxman J.J., Heras B. 2017. Autotransporter adhesins in *Escherichia coli* pathogenesis. *Proteomics.* 17(23-24):1600431.
- Waller C.M., Bilkei G., Cameron R.D.A. 2002. Effect of periparturient diseases accompanied by excessive vulval discharge and weaning to mating interval on sow reproductive performance. *Aust Vet J.* 80(9):545-549.
- Walter J., Schwab C., Loach D.M., Gänzle M.G., Tannock G.W. 2008. Glucosyltransferase A (GtfA) and inulosucrase (Inu) of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 contribute to cell aggregation, in vitro biofilm formation, and colonization of the mouse gastrointestinal tract. *Microbiology* 154: 72-80.
- Walsh M.C., Gardiner G.E., Hart O.M., Lawlor P.G., Daly M., Lynch B., Richert B.T., Radcliffe S., Giblin L., Hill C., Fitzgerald G.F., Stanton C., Ross P. 2008. Predominance of a bacteriocin-producing component of a five-strain probiotic in the porcine ileum and effects on host *Lactobacillus salivarius* immune phenotype. *FEMS Microbiol Ecol.* 64(2):317-327.
- Wang A., Yu H., Gao X., Li X., Qiao S. 2009. Influence of *Lactobacillus fermentum* I5007 on the intestinal and systemic immune responses of healthy and *E. coli* challenged piglets. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 96(1):89-98.
- 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 J., Li C., Nesengani L.T., Gong Y., Zhang S., Lu W. 2017. Characterization of vaginal microbiota of endometritis and healthy sows using high-throughput pyrosequencing of 16S rRNA gene. *Microb Pathog.* 111:325-330.
- Wang X., Yan Q., Xia X., Zhang Y., Li D., Wang C., Chen S., Hou R. 2013a. Serotypes, virulence factors, and antimicrobial susceptibilities of vaginal and fecal isolates of *Escherichia coli* from giant pandas, *Appl. Environ. Microbiol.* 79:5146-5150.
- Wang Y., Ametaj B.N., Ambrose D.J., Gänzle M.G. 2013b. Characterisation of the bacterial microbiota of the vagina of dairy cows and isolation of pediocin-producing *Pediococcus acidilactici*. *BMC Microbiol.* 13:19.
- Wanyoike S.K., Bilkei C. 2006. Concurrent pathological and bacteriological findings in the urogenital organs and mammary glands of sows culled because of chronic vulvovaginal discharge and swine urogenital disease (SUGD): a case study. *Tijdschr Diergeneesk.* 131(19):686-691.
- Whiteside S.A., Razvi H., Dave S., Reid G., Burton J.P. 2015. The microbiome of the urinary tract—a role beyond infection. *Nat Rev Urol.* 12(2):81-90.
- Wichmann F., Udikovic-Kolic N., Andrew S., Handelsman J. 2014. Diverse antibiotic resistance genes in dairy cow manure. *mBio* 5(2):e01017-13.
- Witkin S.S., Mendes-Soares H., Linhares I.M., Jayaram A., Ledger W.J., Forney L.J. 2013. Influence of vaginal bacteria and D- and L-lactic acid isomers on vaginal extracellular matrix metalloproteinase inducer: implications for protection against upper genital tract infections. *MBio* 4, e00460-13.

- Wright K.J., Seed P.C., Hultgren S.J., 2005. Uropathogenic *Escherichia coli* flagella aid in efficient urinary tract colonization. *Infect. Immun.* 73:7657–7668.
- Wright K.J., Seed P.C., Hultgren S.J. 2007. Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* depends on type 1 pili. *Cell. Microbiol.* 9:2230–2241.
- Wu X., Hou S., Zhang Q., Ma Y., Zhang Y., Kan W., Zhao X. 2016. Prevalence of virulence and resistance to antibiotics in pathogenic enterococci isolated from mastitic cows. *J Vet Med Sci.* 78(11):1663-1668.
- Yang F., Hou C., Zeng X., Qiao S. 2015. The use of lactic acid bacteria as a probiotic in swine diets. *Pathogens.* 4:34e45.
- Yang Y., Zhao X., Le M.H.A., Zijlstra R.T. Gänzle, M.G. 2015. Reutericyclin producing *Lactobacillus reuteri* modulates development of fecal microbiota in weanling pigs. *Front Microbiol.* 6: 762.
- Zhang J., Deng J., Wang Z., Che C., Li Y.F., Yang Q. 2011. Modulatory effects of *Lactobacillus salivarius* on intestinal mucosal immunity of piglets. *Curr Microbiol.* 62(5):1623-1631.
- Zhao J., Wang J., Yang Y., Li X., Sun C. 2015. In vitro assessment of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from vaginas of healthy cows. *Indian J Anim Res.* 49(3): 355-359.
- Zhou Y., Blanco L.P., Smith D.R., Chapman M.R. 2012. Bacterial amyloids. *Methods Mol. Biol.* 849:303–320.
- Zhou X., Bent S.J., Schneider M.G., Davis C.C., Islam M.R., Forney L.J. 2004. Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. *Microbiology-Sgm* 150:2565–2573.
- Zhu Y., Dong W., Ma J., Yuan L., Hejair H.M., Pan Z., Liu G., Yao H. 2017. Characterization and virulence clustering analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from swine in China. *BMC Vet Res.* 13(1):94.
- Zhu Y.G., Johnson T., Su J.Q., Qiao M., Guo G.X., Stedtfeld R.D., Hashsham S.A., Tiedje J.M. 2013. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *PNAS* 110: 3435–3440.
- Zogaj X., Bokranz W., Nimtz M., Römling U. 2003. Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family *Enterobacteriaceae* isolated from the human gastrointestinal. *Tract. Infect. Immun.* 71(7):4151-4158.



*TESIS DOCTORAL*  
2018

BIOQ. ANDREA TORRES LUQUE