(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 718 491**

(51) Int. CI.:

A61K 39/02 (2006.01)
A61K 39/108 (2006.01)
A61K 39/114 (2006.01)
A61P 15/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.10.2013 PCT/US2013/063866**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **05.06.2014 WO14084964**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2013 E 13858593 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 2925353**

(54) Título: **Vacuna para enfermedad intrauterina**

(30) Prioridad:

29.11.2012 US 201261731333 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.07.2019

(73) Titular/es:

CORNELL UNIVERSITY (100.0%)
Cornell Center for Technology, Enterprise & Commercialization ("CCTEC") 395 Pine Tree Road Suite 310
Ithaca, NY 14850, US

(72) Inventor/es:

BICALHO, RODRIGO CARVALHO;
GILBERT, ROBERT OWEN;
MACHADO, VINICIUS y
BICALHO, MARCELA

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vacuna para enfermedad intrauterina

Referencia cruzada para aplicaciones relacionadas

Esta solicitud reivindica prioridad para la solicitud provisional de EE.UU. nº 61/731,333, presentada el 29 de noviembre de 2012.

Campo de la descripción

La presente descripción se refiere generalmente a la salud de rumiantes y más específicamente a composiciones y métodos para mitigar los efectos de infecciones bacterianas que están relacionadas con enfermedades uterinas.

Antecedentes de la descripción

Las enfermedades uterinas puerperales de vacas lecheras ponen en peligro el bienestar de los animales y pueden dar lugar a la retirada anticipada del ganado o al rendimiento reproductivo insuficiente. La metritis puerperal se define por un útero anormalmente agrandado y una descarga uterina fétida, acuosa, pardo-rojiza asociada a signos de enfermedad general (menor rendimiento en leche, torpeza u otros signos de toxemia) y temperatura >39,5ºC en los 21 días después del parto, mientras que la endometritis se refiere a la inflamación del útero sin enfermedad general, que sucede 21 días después del parto. En Norteamérica, la metritis afecta entre el 10% y el 20% de las vacas, mientras que la incidencia de la endometritis es aproximadamente 28%, oscilando entre el 5.3% y el 52.6%. La metritis puerperal se trata frecuentemente con antibióticos como la penicilina o cefalosporinas de tercera generación. Sin embargo, la resistencia a los antibióticos en todo el mundo está reconocida como un desafío máximo a la salud pública y por lo tanto existe interés creciente respecto al posible impacto del amplio uso de antibióticos en los piensos animales, incluidas las cefalosporinas de generación posterior. El coste de cada caso de metritis se ha publicado que es de aproximadamente 329-386 $, debido al tratamiento con antibióticos y a los efectos perjudiciales de la metritis sobre el rendimiento reproductivo, la producción láctea y la supervivencia. Por lo tanto, existe necesidad constante y no satisfecha de composiciones y métodos para su uso en la profilaxis contra enfermedades uterinas. La presente descripción satisface estas necesidades.

Breve compendio de la descripción

La presente descripción proporciona en un aspecto un método para la profilaxis de metritis puerperal en un rumiante. El método generalmente comprende administrar por vía subcutánea una composición veterinaria a un mamífero rumiante. La composición veterinaria comprende proteína leucotoxina (LKT) de *Fuseobacterium necrophorum* (*F. necrophorum*), proteína adhesina de fimbrias (FimH) tipo 1 de *Escherichia coli* (*E. coli*) y la proteína piolisina (PLO) de *T. pyogenes*. La composición veterinaria puede comprender las células completas *Escherichia coli* (*E. coli*), *Trueperella pyogenes* (*T. pyogenes*) y/o *Fuseobacterium necrophorum* (*F. necrophorum*); y/o leucotoxina (LKT) de *F. necrophorum*, adhesina de fimbrias (FimH) tipo 1 de *E. coli* y piolisina (PLO) de *T. pyogenes* y combinaciones de las células completas y las proteínas, en donde la composición veterinaria comprende proteína leucotoxina (LKT) de *Fuseobacterium necrophorum* (*F. necrophorum*), proteína adhesina de fimbrias (FimH) tipo 1 de *Escherichia coli* (*E. coli*) y proteína piolisina (PLO) de *T. pyogenes*. En realizaciones, la composición veterinaria comprende las células completas *E. coli*, *T. pyogenes* y *F. necrophorum*. La composición comprende las proteínas FimH, PLO y LKT. En realizaciones, la composición veterinaria comprende las células completas *E. coli*, *T. pyogenes* y *F. necrophorum* y las proteínas FimH, PLO y LKT.

Cabe esperar que el método sea adecuado para su uso con cualquier mamífero rumiante. En realizaciones, el rumiante es un miembro del género *Bos*, como un buey, una vaca o un búfalo, y en determinadas realizaciones, el rumiante es una vaca lechera.

En un método, la vaca lechera es un miembro de un grupo de vacas lecheras y el método incluye la administración subcutánea de la composición veterinaria a las demás vacas lecheras en el grupo, de tal manera que se reduce la incidencia de metritis puerperal en el grupo.

En otro aspecto, la descripción incluye mejorar la función reproductiva de un rumiante. El método para mejorar la función reproductiva de un rumiante comprende administrar por vía subcutánea al rumiante una composición veterinaria como se describe en la presente memoria de modo que la función reproductiva del rumiante se mejore.

En otro aspecto, la descripción incluye una composición veterinaria que comprende células completas seleccionadas entre células completas de *E. coli*, *T. pyogenes*, *F. necrophorum* y combinaciones de las mismas; proteínas seleccionadas de *F. necrophorum* LKT, *E. coli* FimH, PLO y combinaciones de las mismas; y cualquier combinación de las células completas y las proteínas.

También se describe un artículo de fabricación. El artículo de fabricación comprende el embalaje y al menos un recipiente sellado. El recipiente contiene una composición veterinaria que comprende proteínas leucotoxina (LKT) de *F. necrophorum*, proteína adhesina de fimbrias (FimH) tipo 1 de *E. coli* y proteína piolisina (PLO) de *T. pyogenes*. La

composición veterinaria puede comprender células completas de *E. coli*, *T. pyogenes* y/o *F. necrophorum* y combinaciones de las mismas; LKT de *F. necrophorum*, FimH de *E. coli* y proteína PLO de *T. pyogenes* y cualquier combinación de las células completas y las proteínas, de modo que la composición veterinaria comprende proteína leucotoxina (LKT) de *F. necrophorum*, proteína adhesina de fimbrias (FimH) tipo 1 de *E. coli* y proteína piolisina (PLO) de *T. pyogenes*. El envase comprende además material impreso que proporciona una indicación de que la composición veterinaria es para administración subcutánea a un rumiante para la profilaxis de la metritis puerperal, y/o para aumentar la función reproductiva del rumiante.

Descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un ejemplo de la prevalencia de factores de virulencia específicos de especies bacterianas, *lktA* (*Fusobacterium necrophorum*), *fimH* (*Escherichia coli*), y *fimA* y *plo* (*Arcanobacterium pyogenes*) en 3 etapas diferentes de lactación. *FV≥ 1 = Al menos un factor de virulencia presente.

La figura 2 muestra un ejemplo de un efecto de detección de *fimH* en 1-3 días en lactación (DEL) en el rendimiento reproductivo. La línea negra continua representa vacas *fimH* negativas y la línea interrumpida vacas *fimH* positivas. En las vacas *fimH* positivas eran 2.1 veces menos probable que se confirmara la gestación que en las vacas *fimH* negativas (P <0.001).

La figura 3 muestra un ejemplo de un efecto de la vacunación en la temperatura rectal a 6 ± 1 DEL. Las vacunas se evaluaron por separado (A, valor P = 0.14) y se agrupadas (B, valor P = 0.018). Los errores típicos de los medios están representados por las barras de error.

La figura 4 muestra un ejemplo de un efecto de la vacunación en IgG sérica detectada por ELISA contra *E. coli* (A), FimH (B), *F. necrophorum* (C), LKT (D), *T. pyogenes* (E) y OLP (F). El eje X representa los días en relación con el parto, mientras que el eje Y representa la OD_{650} de IgG sérica detectada por ELISA contra varios antígenos. Los errores típicos de los medios están representados por las barras de error.

La figura 5 muestra un ejemplo de análisis de supervivencia de Kaplan-Meier del intervalo entre el parto y la concepción por tratamiento agrupado como referencia, vacunas subcutáneas y vacunas intravaginales. El intervalo entre el parto y la concepción para vacunas subcutáneas (línea interna interrumpida), vacunas intravaginales (línea media interrumpida) y referencia (línea continua) fue de 94, 114 y 120 respectivamente. (Valor P = 0.04).

Descripción detallada de la descripción

La presente descripción está generalmente dirigida a composiciones y métodos para mejorar la salud de los rumiantes, y más específicamente a la profilaxis de la enfermedad intrauterina de los rumiantes.

Se evaluaron varias propuestas diferentes para desarrollar composiciones y métodos dirigidos a mitigar enfermedades intrauterinas en rumiantes y se evaluaron estas propuestas para una variedad de efectos sobre la metritis y la endometritis, entre otras respuestas. Como se conoce en la técnica, la metritis generalmente implica inflamación de la pared del útero, mientras que la endometritis generalmente implica inflamación del endometrio. Las propuestas incluyeron preparar distintas formulaciones de vacunas y evaluar los efectos de las diferentes formulaciones y vías de administración en aspectos de la salud de los rumiantes. Estos efectos incluyen la estimulación de respuestas inmunológicas contra bacterias y proteínas bacterianas, efectos sobre la endometritis y metritis, efectos sobre la contaminación bacteriana intrauterina, efectos sobre los síntomas relacionados con la enfermedad uterina, como la temperatura rectal, y efectos sobre la función reproductiva. Los resultados que se obtuvieron fueron inesperados ya que los autores descubrieron que solo la administración subcutánea era profiláctica para la metritis puerperal, y solo la administración subcutánea era eficaz para mejorar la función reproductiva en los rumiantes. También se determinó que la vacunación intravaginal y subcutánea provocaba un aumento significativo en los valores séricos de IgG contra todos los antígenos, pero la vacunación subcutánea era más eficaz para estimular la producción de IgG. Sin embargo, a pesar de los resultados positivos para la profilaxis de la metritis y las mejoras en la función reproductiva obtenidas mediante la administración subcutánea, ninguna de las vacunas, independientemente de la vía de administración, protegía contra la endometritis o reducía significativamente la probabilidad de contaminación bacteriana intrauterina. De este modo, como se describirá con más detalle a continuación, la presente invención proporciona composiciones novedosas y eficaces para su utilización en métodos de profilaxis de metritis puerperal y composiciones para su utilización como medicamento para mejorar la función reproductiva en rumiantes, así como otras ventajas que serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la presente descripción.

En realizaciones, el rumiante al que se administra una composición de la invención es un miembro del género *Bos*, tal como un buey, una vaca o un búfalo. En una realización, el rumiante es una vaca lechera.

La presente descripción incluye composiciones que comprenden células completas y/o uno o más inmunógenos diferentes. En realizaciones, las composiciones comprenden células completas de *Escherichia coli* (*E. coli*), *Trueperella pyogenes* (*T. pyogenes*) y *Fusobacterium necrophorum* (F. necrophorum). Las composiciones comprenden leucotoxina (LKT) de *F. necrophorum*, adhesina de fimbrias tipo 1 (FimH) de *E. coli*, y piolisina (PLO) de *T. pyogenes*. En realizaciones las composiciones comprenden cualquier combinación de las células completas y las

proteínas de manera que la composición veterinaria comprende proteína leucotoxina (LKT) de *F. necrophorum*, proteína adhesina de fimbrias tipo 1 (FimH) de *E. coli*, y proteína piolisina (PLO) de *T. pyogenes*. Por lo tanto, las composiciones comprenden uno, dos o tres tipos distintos de bacterias. En realizaciones, se puede incluir más de una cepa de cualquier tipo de bacteria en la composición veterinaria. También pueden incluirse más tipos de bacterias y proteínas.

Cualquiera de las proteínas descritas en la presente memoria puede aislarse de bacterias que producen las proteínas de forma endógena y, si se desea, purificarse en cualquier grado de pureza. Cualquiera de las proteínas también se puede reproducir de forma biotecnológica utilizando técnicas convencionales, como mediante la expresión utilizando cualquier vector de expresión y sistema de expresión adecuados. Las secuencias de aminoácidos y las secuencias de polinucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos de cada una de las proteínas descritas en la presente memoria son conocidas en la técnica.

En las realizaciones, la composición comprende un vehículo, excipiente o diluyente veterinariamente aceptable de manera que la composición es una composición veterinaria. Los vehículos, excipientes y diluyentes adecuados son conocidos en la técnica. En realizaciones, la composición veterinaria funciona como una vacuna.

Las células bacterianas completas en la composición veterinaria pueden inactivarse usando cualquiera de una amplia variedad de métodos. Las bacterias inactivadas son las que se han tratado para que tengan menos patogenicidad en relación con las bacterias que no se tratan de manera similar. En realizaciones, las bacterias se inactivan, tal como por exposición a un disolvente orgánico, un ejemplo no restrictivo del cual es la formalina.

Las composiciones veterinarias también pueden comprender cualquier otro agente que cabría esperar que proporcionara una ventaja terapéutica y/o profiláctica al receptor, tal como antibióticos y/o adyuvantes. Los adyuvantes que son adecuados para su uso con composiciones veterinarias son bien conocidos en la técnica. En una realización, el adyuvante es hidróxido de aluminio. Los ejemplos no restrictivos de otros adyuvantes incluyen liposomas y arqueosomas, sales de calcio, emulsiones de aceite, nanopartículas y micropartículas, saponinas, complejos inmunoestimulantes, copolímeros de bloque no iónicos, polisacáridos modificados, proteínas transportadoras, productos bacterianos y sus derivados, citocinas, derivados del complemento, y otros. En determinadas realizaciones, el método puede llevarse a cabo antes, simultáneamente o después de las propuestas antibacteriana y antinflamatoria, incluidos entre otros los regímenes de antibióticos.

La presente descripción incluye un artículo de fabricación que comprende un envase y al menos un recipiente sellado. El recipiente sellado puede comprender las composiciones veterinarias. Las composiciones veterinarias comprenden proteína leucotoxina (LKT) de *F. necrophorum*, proteína adhesina de fimbrias tipo 1 (FimH) de *E. coli*, y proteína piolisina (PLO) de *T. pyogenes*. Las composiciones veterinarias pueden comprender células completas seleccionadas de *E. coli*, *T. pyogenes*, *F. Necrophorum* y combinaciones de las mismas. El recipiente puede comprender proteínas LKT de *F. necrophorum*, FimH de *E. coli*, PLO de *T. pyogenes*. En realizaciones el recipiente incluye cualquier combinación de células completas y proteínas de modo que la composición veterinaria comprende proteína leucotoxina (LKT) de *F. necrophorum*, proteína adhesina de fimbrias tipo 1 (FimH) de *E. coli*, y proteína piolisina (PLO) de *T. pyogenes*. En realizaciones, el envase puede tener más de un recipiente que contiene por separado una combinación cualquiera de las células y/o las proteínas. El envase comprende material impreso que proporcionan una indicación de que la composición veterinaria es para administración a un rumiante y puede incluir una descripción de administración subcutánea y una indicación de que la administración es para la profilaxis de la metritis en un rumiante y/o para mejorar la función reproductiva de un rumiante.

La descripción proporciona métodos para fabricar composiciones veterinarias y artículos de fabricación. El método para preparar una composición veterinaria comprende proporcionar células completas de *E. coli*, *T. pyogenes* y/o *F. necrophorum*, y/o LKT y/o FimH y/o PLO, y combinar estos agentes con un vehículo, excipiente y/o diluyente veterinariamente aceptable para proporcionar una composición veterinaria para su utilización en la profilaxis de la metritis y/o para su utilización en la mejora de la función reproductiva de un rumiante en donde la composición veterinaria comprende proteína leucotoxina (LKT) de *F. necrophorum*, proteína adhesina de fimbrias tipo 1 (FimH) de *E. coli*, y proteína piolisina (PLO) de *T. pyogenes*. Para hacer un artículo de fabricación, las composiciones veterinarias se colocan en recipientes adecuados y se envasan. El paquete está hecho para incluir material impreso que proporciona una indicación de que las composiciones veterinarias son para su utilización en administración subcutánea para la profilaxis de la metritis. y/o para mejorar la función reproductiva de los rumiantes. El material impreso puede formar parte del material de envasado, o puede ser un prospecto de papel, o puede ser una etiqueta pegada, por ejemplo, al recipiente o recipientes.

También se describe un método para estimular una respuesta inmunitaria en un rumiante. El método comprende administrar una composición veterinaria descrita en la presente memoria a un rumiante. La respuesta inmunitaria puede comprender una respuesta humoral y/o mediada por células. La respuesta humoral puede comprender un aumento en las inmunoglobulinas específicas para cualquier antígeno expresado por las bacterias y/o específicas para cualquiera de las proteínas administradas en la composición veterinaria. En las descripciones, las inmunoglobulinas estimuladas son IgG. La respuesta inmunitaria en determinadas descripciones proporciona un efecto profiláctico contra la metritis puerperal. Los términos "profilaxis" y "profiláctico", empleados en la presente memoria, significan al menos una inhibición parcial de la formación y/o la persistencia de los síntomas asociados con

una enfermedad uterina, y en particular con metritis puerperal.

Los expertos en la técnica podrán determinar, dado la utilidad de la presente descripción, cuándo y con qué frecuencia administrar las composiciones y qué cantidad incluir de cada agente inmunógeno. En general, los factores que intervendrán en esta determinación incluyen pero no se limitan necesariamente a, el tipo, el tamaño, la edad y la salud general del rumiante. En realizaciones, las composiciones se administran al rumiante antes del parto, pero pueden administrarse durante la gestación o en cualquier momento durante el ciclo vital.

En determinadas descripciones de la presente descripción, la administración subcutánea de una composición veterinaria a un rumiante disminuye un aumento en la temperatura rectal del rumiante debido a una infección bacteriana, relativa a la temperatura rectal de un rumiante con la infección bacteriana pero a la cual no se administraron composiciones veterinarias.

En una realización, la administración a un rumiante de una composición veterinaria descrita en la presente memoria mejora la función reproductiva del rumiante. Una mejora en la función reproductiva puede comprender una reducción en un intervalo parto a concepción en relación con el intervalo de parto a concepción en un rumiante al que no se le ha administrado una composición veterinaria.

En las realizaciones, la presente descripción incluye disminuir la incidencia de la metritis puerperal en un grupo de animales que comprende administrar una composición veterinaria como la descrita en la presente memoria por vía subcutánea a miembros de un grupo de animales, de manera que la incidencia de la metritis puerperal en el grupo de animales es menor que si la composición no se hubiera administrado. En determinadas realizaciones, el grupo de animales es de vacas lecheras. El grupo de animales puede estar presente, por ejemplo, en una granja lechera de cualquier escala, desde unas pocas vacas lecheras hasta una granja lechera comercial que puede albergar miles de vacas lecheras.

Los ejemplos siguientes se presentan para ilustrar la presente descripción.

Ejemplo 1

Este ejemplo muestra la relación entre los factores de virulencia (FV) específicos de especies bacterianas presentes en el útero en 3 etapas diferentes de la lactancia (1-3, 8-10 y 34-36 días en lactación (DEL)) y la Incidencia de la metritis y endometritis clínica en vacas lecheras. Se investigaron los siguientes genes de FV: *plo* (piolisina), *cbpA* (proteína de unión al colágeno) y *fimA* (expresión de fimbrias) que son específicos de *Arcanobacterium pyogenes*; *firmA* (un componente de pilus tipo 1), específico para *Escherichia coli*; e *lktA* (leucotoxina), específico para *Fusobacterium necrophorum*. Se recogieron hisopos uterinos de 111 vacas lecheras puerperales. Se usó PCR para detectar la presencia de los genes *plo*, *cbpA*, *fimA*, *fimH* e *lktA*. Se detectó *cbpA* de *A. pyogenes* en solo 5 muestras y, por lo tanto, no se sometió a análisis. *E. coli* (*fimH*) se asoció significativamente a la metritis y la endometritis cuando se detectó en 1-3 DEL; *F. necrophorum* (*lktA*) se asoció significativamente con la metritis cuando se detectó a 1 -3 y 8- 12 DEL y con endometritis cuando se detectó a 34-36 DEL; y *A. pyogenes* (*fimA* y *plo*) se asoció a la metritis (*fimA*) cuando se detectó en 1-3 DEL y la endometritis (*fimA* y *plo*) cuando se detectó a 8-10 y 34-36 DEL.

Explotación, gestión y recogida de muestras. Se recogieron hisopos uterinos de 111 vacas lecheras puerperales que se alojaron en una granja lechera comercial ubicada cerca de Ithaca, Nueva York. Las muestras se recolectaron desde abril de 2010 hasta junio de 2010. La gestión reproductiva utilizó una combinación de Presynch, Ovsynch, Resynch y detección de estro, con 25 a 30% de vacas criadas con TAI y el resto criado después de la detección de estro únicamente mediante monitores de actividad (ALPRO; DeLaval, Kansas City, MO). Se recogieron muestras de secreción uterina de cada vaca tres veces durante el período del estudio (a 1-3 DEL, a 8-10 DEL, y a 34-36 DEL). Se utilizaron dos métodos de recogida de muestras uterinas: hisopo uterino para la primera y segunda muestras y lavado uterino para la tercera muestra. A los 34-36 DEL, el útero por lo general se ha encorvado y el volumen del líquido uterino ha disminuido. Por lo tanto, en este momento, realizar un lavado uterino es probablemente una mejor forma de muestreo. Además, el lavado uterino también se usó a 34-36 DEL para el diagnóstico de la endometritis. Se recogieron hisopos uterinos de la siguiente manera: se restringieron las vacas y el área del perineo se limpió y desinfectó con etanol al 70%. A continuación, se introdujo en la vagina craneal un hisopo estéril (Har-Vet™ McCullough Double-Guarded Uterine Culture Swab, Spring Valley, WI) cubierto por una pipeta estéril (dentro de una funda de plástico). La pipeta se manipuló a través del cuello uterino en el útero, la vaina se rompió entonces y el hisopo se expuso a la secreción uterina. El hisopo se introdujo dentro de la pipeta y se mantuvo en medio de transporte a 4°C hasta que se procesó en el laboratorio. Se recogieron muestras de lavado uterino. En resumen, se restringieron las vacas y el área del perineo se limpió y desinfectó con etanol al 70%. Se introdujo una pipeta de infusión de plástico (dentro de una funda de plástico) en la vagina craneal. La funda se rompió posteriormente y la punta de la pipeta limpia se manipuló a través del cuello uterino en el útero. Se inyectaron un total de 40 ml de solución salina estéril en el útero, se agitó suavemente y se aspiró una muestra del líquido. El volumen de fluido recuperado osciló entre 5 y 15 ml. Las muestras se mantuvieron en hielo antes del tratamiento en el laboratorio. Esta propuesta de proyecto fue estudiada y aprobada por el Institutional Animal Care and Use Committee de la Universidad de Cornell (# 2011-0111).

Definición de caso. La metritis puerperal se definió clínicamente como un útero anormalmente agrandado y una

secreción uterina fétida, acuosa, de color marrón rojizo, con signos de enfermedad general (disminución del rendimiento de la leche, torpeza u otros signos de toxemia) a los 8-10 días después del parto y diagnosticada por uno de los veterinarios del equipo de investigación. La endometritis clínica de una muestra de lavado uterino obtenida se evaluó a 34-36 DEL mediante inspección visual. De esta manera, se pudo asegurar que los signos visibles de inflamación (exudado purulento o mucopurulento) emanaban del útero, en lugar de hacerlo de otro sitio. Todas las muestras de lavado uterino fueron evaluadas visualmente por un investigador, quien evaluó la presencia de una secreción purulenta o mucopurulenta en la muestra de lavado uterino. La puntuación osciló entre 0 y 2, indicando 0 la ausencia de una secreción purulenta o mucopurulenta en la muestra de lavado, indicando 1 una muestra sangrienta pero no purulenta y 2 la presencia de pus en la muestra de lavado. Las vacas con una puntuación de 2 se consideraron diagnosticadas con endometritis clínica. Las puntuaciones de estado corporal se registraron en el momento de cada lavado uterino utilizando una escala de cinco puntos con un sistema de un cuarto de punto. Además, se usaron como factores de riesgo la puntuación 1-5 de facilidad de partos registrada en la granja (1 y 2 fueron partos no asistidos y 3 a 5 fueron partos asistidos con mayor grado de dificultad), parto de mortinato e incidencia de retención de placenta.

Extracción de ADN, PCR, electroforesis en gel y secuenciación. Las muestras de hisopo se sumergieron en 1 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) en un tubo Falcon de 15 ml y se agitaron para dispersar cualquier moco, bacteria, célula o medio de cultivo de transporte. El aislamiento del ADN total se realizó en 400 µl de la suspensión utilizando un QIAmp DNA minikit (Qiagen, Santa Clara, CA) según las instrucciones del fabricante para la purificación de ADN de sangre y fluidos corporales. Se incluyeron algunas modificaciones convenientes, como la adición de 400 µg de lisozima y la incubación durante 12 horas a 56°C, para maximizar la extracción de ADN bacteriano. Todo el ADN se eluyó en 100 µl de agua estéril sin ADNasa/ARNasa (Promega, Madison, WI). La concentración de ADN y la pureza se evaluaron por densidad óptica utilizando el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Rockland, DE).

Se usó la PCR para la amplificación de partes específicas de genes FV. Entre los genes FV que contribuyen al potencial patógeno de *A. pyogenes*, se amplificaron tres: *plo*, *cbpA* y *fimA*. Para clasificar *E.coli*, se eligió el gen *fimH*. El gen de la leucotoxina (*lktA*), que parece ser único para *F. necrophorum*, se usó como FV de esa bacteria. Los detalles sobre las secuencias del cebador, las temperaturas de hibridación y el tamaño de los amplicones pueden encontrarse en la tabla 1. La presencia de genes FV conocidos y supuestos de *A. pirogenes*, *E. coli* y *F. necrophorum* se evaluó de forma independiente. Los parámetros de ciclación térmica se ajustaron según la secuencia objetivo, como se describe en la tabla 1. Todas las reacciones se realizaron en un volumen de 25 µl usando 24 µl de 1 x Green GoTaq Master Mix (hecho de 2xGreen GoTaq Master Mix que consiste en un Green GoTaqReaction Buffer, dATP 400 µM, dGTP 400 µM, dCTP 400 µM, DTTP 400 µM y $MgCl_2$ 3 mM; Promega Corp., Madison, WI) y cebadores, y 1 µl de extracto de ADN. Todos los protocolos de ciclos térmicos se realizaron en un 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA). En todas las series de PCR se incluyeron referencias negativas que consistían en la mezcla de PCR sin ADN. Los productos de amplificación se separaron por electroforesis a través de un gel de agarosa al 1.2% (peso/vol), se tiñeron con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio y se visualizaron con un sistema de diagnóstico por la imagen Gel Logic 100 de Kodak (GL 100, Scientific Imaging Systems, Eastman Kodak Co., New Haven, CT). Los resultados positivos se consideraron amplicones del tamaño molecular esperado.

Tabla 1. Cebadores de PCR y condiciones de reacción utilizados para amplificar las secuencias de genes del factor de virulencia.

Gen diana	Secuencia de cebador (5'-3')	Temperatura de hibridación (ºC)	Tamaño del amplicón (pb)
Plo	Directo – TCATCAACAATCAACGAAGAG (SEQ. ID. nº: 1) Inverso - TTGCCTCCAGTTGACGCTTT (SEQ. ID. nº: 2)	60	150
cbpA	Directo – GCAGGGTTGGTGAAAGAGTTTACT (SEQ. ID. nº: 3) Inverso – GCTTGATATAACCTTCAGAATTTGCA (SEQ. ID. nº: 4)	60	124
fimA	Directo – CACTACGCTCACCATTCACAAG (SEQ. ID. nº: 5) Inverso – CGTGTAATCCGCTTTGTCTGTG (SEQ. ID. nº: 6)	57	605
fimH	Directo – TGCAGAACGGATAAGCCGTGG (SEQ. ID. nº: 7) Inverso – GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA (SEQ. ID. nº: 8)	63	508
lktA	Directo – AATCGGAGTAGTAGGTTCTG (SEQ. ID. nº: 9) Inverso – TTTGGTAACTGCCACTGC (SEQ. ID. nº: 10)	60	401

Para confirmar el origen de los productos de PCR, se purificó una muestra aleatoria de 5 muestras positivas a PCR

de cada uno de los genes *fimH*, *plo*, *fimA* e Ikta y se sometió a secuenciación. Las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias en GenBank utilizando el algoritmo BLAST. Todas las secuencias emparejaron sus genes respectivos con una identidad de secuencia > 98%.

Análisis estadístico. Las vacas se dicotomizaron varias veces en FV positivo (1) o FV negativo (0). Para evaluar la relación entre la presencia del gen FV y las probabilidades de metritis y endometritis clínica, se ajustaron dos modelos de regresión logística multivariable a los datos; las variables dependientes fueron metritis (sí - no) y endometritis clínica (sí - no). Las variables independientes ofrecidas a los modelos fueron: parto asistido (puntuación de facilidad de parto ≥ 3), retención de placenta, grupo de número de partos (1, 2, ≥ 3), puntuación de estado corporal y los FV, *fimH*, *plo*, *fimA* e *IktA* en 1 -3, 8-10 y 34-36 DEL. Todos los términos de interacción bidireccionales posibles se agregaron al modelo. Las variables se eliminaron manualmente y por pasos de los modelos en orden descendente de valor P (eliminación hacia atrás). Se consideraba significación estadística cuando se observaba una p <0.05. Se llevó a cabo otra serie de regresiones logísticas multivariables para evaluar la asociación entre factores de riesgo (parto asistido, retención de placenta, número de partos (1, 2, ≥ 3), puntuación de estado corporal) y los FV anteriores que estaban significativamente asociados a una enfermedad uterina.

Se realizó un análisis de supervivencia de Kaplan-Meier para evaluar la asociación de los genes de FV (*plo*, *cbpA*, *fimA*, *fimH* e *IktA*) con rendimiento reproductivo utilizando Medcalc versión 10.4.0.0 (Mariakerke, Bélgica); para calcular los valores de F se usó la prueba de Logrank. La variable de la serie de tiempo para este modelo fue el intervalo de parto a la concepción o los días desde el parto hasta el final del período de seguimiento; el período mínimo de seguimiento fue de 150 y el máximo de 250. Se consideraba significación estadística cuando se observaba $P < 0.05$.

Se obtuvieron los siguientes resultados utilizando los materiales y métodos descritos anteriormente.

Estadística descriptiva. En este estudio se utilizaron 111 vacas Holstein, de las cuales 56 (50.4%) fueron primíparas, 34 (30.6%) fueron de segundo parto y 21 (18.9%) fueron de tercer parto o más. El FV *cbpA* de *A. pyogenes* no se identificó en el primer muestreo (1-3 DEL), y se identificaron 2 y 3 vacas con 8-10 y 34-36 DEL, respectivamente. Debido a su baja prevalencia, se excluyó FV *cbpA* de todos los análisis de asociación de enfermedades. Los FV *fimA* y *plo* de *A. Pyogenes* eran prevalentes en las 3 muestras diferentes (1-3, 8-10 y 34-36 DEL) y la prevalencia más alta se observó en 8-10 DEL (Figura 1). El FV más frecuente fue el FV *IktA* de *F. necrophorum*, que codifica una exotoxina (leucotoxina). El FV *fimH* de *E. coli* también se detectó en los 3 períodos de muestreo, siendo más frecuente en 8-10 DEL (Figura 1). La incidencia total de metritis en esta población de estudio fue del 40.5%, y la prevalencia de endometritis clínica diagnosticada en 34-36 DEL fue del 19.8%.

Asociación de factores de virulencia específicos de especies bacterianas y la prevalencia de metritis. Se encontró que dos variables afectaban significativamente (P <0.05) a la prevalencia de metritis: la presencia de *fimH* de *E. coli* en 1-3 DEL e *IktA* de *F. necrophorum* diagnosticados en 8-10 DEL (tabla 2). Las vacas contaminadas con *E. coli* positiva a *fimH* tuvieron una probabilidad 4.7 veces mayor de desarrollar metritis en comparación con las vacas negativas a *fimH* (valor P <0,001). FV *IktA* de *F. necrophorum* fue la única FV detectada en 8-10 DEL que se asoció significativamente con metritis; la prevalencia de metritis fue de 54.1% para vacas positivas a IktA y de 24% para vacas negativas a *IktA* (tabla 2).

Tabla 2. Factores de riesgo con un efecto significativo en las probabilidades de metritis diagnosticadas en 8-10 DEL.

Factores de riesgo	Número de vacas	Metritis %	Relación de probabilidades	valor P
fimH de *E. coli* 1-3 puerperal				
POSITIVO	21	76.2%	4.7	*<0.01*
NEGATIVO	90	32.2	*Ref.*	
IktA de *F. necrophorum* 8-10 puerperal				
POSITIVO	61	54.1%	2.6	*0.03*
NEGATIVO	50	24.0%	*Ref.*	

Asociación de factores de virulencia específicos de especies bacterianas y la prevalencia de endometritis clínica. Se encontraron tres variables que afectan significativamente (P<0.05) la prevalencia de la metritis: La presencia de *fimH* de *E. coli* en 1-3 DEL y *fimA* de *A. pyogenes* diagnosticados en 8-10 y 34-36 DEL (tabla 3). FV *fimH* de *E. coli* se asoció a una prevalencia significativamente mayor de endometritis solo cuando se detectó en la primera recogida de muestras (1-3 DEL); la prevalencia de endometritis fue de 38.1% y 15.6% para vacas positivas y negativas a *fimH*, respectivamente (valor P <0.01). *fimA* de *Arcanobacterium pyogenes* estaba relacionada en gran medida con la endometritis clínica cuando se detectó a los 8-10 y 34-36 días después del parto; las vacas que eran fimA positivas en 34-36 DEL tenían 8,8 veces más probabilidades de endometritis clínica en comparación con las vacas

negativas.

Tabla 3. Factores de riesgo con un efecto significativo en las probabilidades de endometritis clínica diagnosticada en 34-36 DEL

Factores de riesgo	Número de vacas	Endometritis %	Relación de probabilidades	valor P
fimH de *E. coli* 1-3 puerperal				
POSITIVO	21	38.1%	5.4	*0.01*
NEGATIVO	90	15.6	*Ref.*	
fimA de *A. pyogenes* 8-10 puerperal				
POSITIVO	39	33.3%	5.6	*< 0.01*
NEGATIVO	72	12.5%	*Ref.*	
fimA de *A. pyogenes* 34-36 puerperal				
POSITIVO	13	61.4%	8.8	*< 0.01*
NEGATIVO	98	14.3%	*Ref.*	

Factores de riesgo para fimH *e 1-3 DEL,* fimA *en 8-10 y 34-36 DEL e* IktA *en 8-10 DEL.* Los resultados con respecto a los factores de riesgo con un efecto significativo en la prevalencia de los FV específicos (*fimH* en 1-3 DEL, *fimA* en 8-10 y 34-36 DEL e *IktA* en 8-10 DEL) se presentan en la tabla 4. Las vacas con una retención de placenta tenían una probabilidad 44.8 veces mayor de estar contaminada con *E. coli* positiva a *fim*H en comparación con las vacas sin una retención de placenta y este fue el efecto más fuerte observado.

Tabla 4. Resultados de 4 modelos diferentes de regresión logística multivariable que evaluaron la asociación de varios factores de riesgo con las probabilidades de prevalencia de los factores de virulencia *fimH* (1-3 DEL), *fimA* (8-10 DEL), *fimA* (34 -36 DEL) e *IktA* (8-10 DEL).

Factores de riesgo	n	%	Relación de probabilidades	valor P
positivo a *fimH* en 1-3 DEL				
Placenta conservada				
Si	10	90.0%	44.8	*<0.01*
NO	101	11.9%	*Ref.*	
IktA de *F. necrophorum* 1 -3 puerperal				
POSITIVO	27	44.4%	4.2	0.02
NEGATIVO	84	10.7%	Ref.	
positivo a fiMA en 8-10 DEL				
IktA de *F. necrophorum* 1-3 puerperal				
POSITIVO	27	11.1%	0.12	*<0.01*
NEGATIVO	84	42.9%	*Ref.*	
IktA de F. necrophorum 8-10 puerperal				
POSITIVO	61	42.6%	2.9	0.01
NEGATIVO	50	26.0%	Ref.	
positivo a *fimA* en 34-36 DEL				
Facilidad de parto				
Asistido	10	40.0	7.2	*0.03*
No asistido	101	8.9	*Ref.*	

IktA de *F. necrophorum* 1 -3 puerperal				
POSITIVO	27	29.6%	5.8	*0.02*
NEGATIVO	84	5.9%	*Ref*.	
IktA de *F. necrophorum* 34-36 puerperal				
POSITIVO	14	57.1%	18.8	*<0.01*
NEGATIVO	97	5.1%	*Ref*.	
		positivo a *iktA* en 8-10 DEL		
Facilidad de parto				
Asistido	10	90.0%	12.6	*0.02*
No asistido	101	51.5%	Ref.	
fimH de *E.coli* 1-3 puerperal				
POSITIVO	21	90.5%	16.2	*<0.01*
NEGATIVO	90	46.7%	*Ref*.	

Asociación de factores de virulencia específicos de especies bacterianas con rendimiento reproductivo. El único FV asociado significativamente al rendimiento reproductivo fue *fimH* en 1-3 DEL; las vacas que eran positivas a FimH en el primer muestreo tenían 2.1 veces menos probabilidades de ser confirmadas preñadas en comparación con las vacas negativas a *FimH* (*P* <0.01, figura 2). Como será evidente a partir de lo anterior, en este ejemplo, la presencia de *E. coli* portadora de *fimH* en 1-3 DEL se asoció fuertemente con la metritis y la endometritis clínica. Sin embargo, *E. coli* no se asoció con enfermedades uterinas cuando se detectó en etapas posteriores de lactancia (8-10 y 34-36 DEL), lo que sugiere que *E. coli* está probablemente entre las primeras bacterias en colonizar el medio intrauterino, lo que podría provocar cambios que favorezcan la futura colonización por bacterias anaeróbicas estrictas (*F. necrophorum*) y facultativas *(A. Pyogenes*) que en última instancia den lugar a signos clínicos de enfermedad uterina. *E. coli* patógena intrauterina (IUBCS) posee un arsenal de FV (*fimH*, *hlyA*, *cdt*, *kpsMII*, *ibeA* y *astA*) asociados a *E. coli* patógena extraintestinal (ExBCS). De los seis FV asociados a metritis y endometritis, *fimH* fue el más significativo debido a su gran prevalencia y fuerte asociación con enfermedades uterinas e insuficiencia reproductiva.

FimH es una adhesina (de pilus tipo 1) que pertenece a una familia de proteínas involucradas en la adherencia bacteriana a varias dianas, incluidas las células anfitrionas de mamíferos. Los resultados de un estudio previo demostraron que *E. coli* clonales aisladas de vacas metríticas eran más adherentes e invasivas en las células del epiteliales y del estroma del endometrio que las bacterias clonales aisladas de animales clínicamente no afectados. Otro estudio también concluyó que las bacterias carecían de genes de patogenicidad generalmente asociados a la virulencia en *E. coli*; evaluaron 17 genes con FV y no se encontró ninguno que estuviera asociado con la enfermedad uterina.

En este ejemplo, las vacas positivas a FimH en 1-3 DEL tenían 16.2 veces más probabilidades de desarrollar contaminación intrauterina por *F. necrophorum* en 8-10 DEL. Estos resultados apoyan la idea de que el establecimiento y la persistencia de la infección uterina por *F. necrophorum* y otras bacterias anaeróbicas gram negativas están influenciados por la presencia de un entorno intrauterino adecuado creado por una infección de *E. coli* precedente. Además, en el presente estudio, la presencia de E. coli portadora de *fimH* en 8-10 o 34-36 DEL no se asoció a metritis, endometritis clínica o insuficiencia reproductiva. De hecho, las vacas *fimH* positivas en 8-10 DEL tuvieron una incidencia numéricamente menor de metritis (32.1%) en comparación con las vacas negativas a *fimH* (43.4%). Este hecho destaca la etiología multifactorial de las enfermedades uterinas puerperales y la hipótesis de que la población microbiana intrauterina cambia a medida que las vacas avanzan hacia su lactancia. Más del 90% de las vacas positivas a *fimH* en 1-3 DEL estaban contaminadas con *F. necrophorum* una semana después y la presencia de *F. necrophorum* fue un factor de riesgo importante para la aparición de *A. pyogenes*.

Las muestras recogidas en 8-10 DEL presentaron la prevalencia bacteriana más alta en comparación con las otras dos etapas de la lactancia; al menos un FV estaba presente en el 71% de las vacas. Curiosamente, se encontró que *A. pyogenes* y *F. necrophorum* predominaban en las muestras del segundo período de recolección. En 8-10 DEL, el FV *IktA* fue el único FV fuertemente asociado a la metritis: la prevalencia de metritis fue del 54.1% para las vacas positivas a *F. necrophorum* y del 24% para las vacas negativas.

En este ejemplo, se encontró que la contaminación uterina por *F. necrophorum* y *A. pyogenes* era mayor en el

segundo y tercer períodos de muestreo, respectivamente, en vacas que necesitaban asistencia durante el parto. Tanto *A. pyogenes* como *F. necrophorum* se asociaron fuertemente con la endometritis clínica cuando se detectaron en el tercer período de muestreo (DEL 34-36) en el estudio en este ejemplo.

En este ejemplo, la retención de placenta aumentó 44.8 veces las probabilidades de contaminación intrauterina por *E. coli* positiva a *fimH*. Además, las vacas que habían asistido al parto tenían un mayor riesgo de contaminación por *F. necrophorum* y *A. pyogenes*. Por lo tanto, la enfermedad uterina está influenciada por los casos de parto y la contaminación bacteriana ambiental desempeña una función importante.

Este ejemplo demuestra que la etiología bacteriana de las enfermedades uterinas puerperales es dinámica y multifactorial, con una contribución significativa de al menos tres bacterias diferentes: *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum* y *Arcanobacterium pyogenes*.

Por último, las vacas que fueron positivas en la primera toma de muestras (1-3 DEL) tenían 2.1 veces menos probabilidades de quedar preñadas en comparación con las vacas negativas a *fimH*; *fimH* fue el único gen de FV significativamente relacionado con un rendimiento reproductivo reducido.

El *fimH* específica de *E. coli* y los genes *IktA* con FV específicos de *F. necrophorum* se asociaron significativamente a una mayor prevalencia de metritis cuando se detectaron en 1-3 y 8-10 DEL, respectivamente. El gen *fimH* específico de *E. coli* y los genes *fimA* con FV específicos de *A. pyogenes* se asociaron significativamente a la endometritis clínica cuando se detectaron a los 1-3 días (*fimH*) y a los 8-10 y 34-36 (*fimA*) DEL.

Ejemplo 2

En este ejemplo, se estudió la eficacia de cinco formulaciones de vacunas que contienen diferentes combinaciones de proteínas (FimH; leucotoxina, LKT y pirolisina, PLO) y/o células completas inactivadas (*Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum* y *Trueperella pyogenes*) para profilaxis de enfermedades uterinas puerperales. La expectativa inicial de los autores era que la inmunización previa al parto contra antígenos relevantes para las enfermedades uterinas puerperales evitaría la aparición de metritis puerperal y endometritis.

Como se describe más adelante, se produjeron células completas inactivadas utilizando dos cepas genéticamente distintas de cada especie bacteriana (*E. coli*, *F. necrophorum* y *T. pyogenes*). Las subunidades FimH y PLO se produjeron utilizando la expresión de proteínas biotecnológicas, y se recuperó LKT del cultivo de una cepa de *F. necrophorum* natural. Se formularon tres vacunas subcutáneas: la vacuna 1 estaba compuesta por células enteras bacterianas inactivadas y proteínas; la vacuna 2 estaba compuesta solo de proteínas; y la vacuna 3 estaba compuesta solo por células completas bacterianas inactivadas. Se formularon dos vacunas intravaginales: la vacuna 4 estaba compuesta por células completas bacterianas inactivadas y proteínas; y la vacuna 5 estaba compuesta por PLO y LKT. Para evaluar la eficacia de la vacuna, se realizó un ensayo clínico al azar en una granja lechera comercial; 371 terneras de primavera se asignaron al azar en uno de seis grupos de tratamientos diferentes: referencia, Vacuna 1, Vacuna 2, Vacuna 3, Vacuna 4 y Vacuna 5. Las terneras preñadas tardías asignadas a uno de los grupos de vacunación se vacunaron cada una dos veces: a los 230 días y 260 días de gestación. Cuando se evaluaron las vacunas y se agruparon como subcutáneas e intravaginales, se encontró que las subcutáneas reducían significativamente la incidencia de metritis puerperal. Además, la vacunación subcutánea redujo significativamente la temperatura rectal a los 6 ± 1 días en lactación. El rendimiento reproductivo mejoró para las vacas que recibieron vacunas subcutáneas. En general, la vacunación provocó un aumento significativo en los valores séricos de IgG frente a todos los antígenos, volviendo a ser más eficaz con la vacunación subcutánea. En conclusión, la vacunación subcutánea con componentes bacterianos inactivados y/o subunidades de proteínas de *E. coli*, *F. necrophorum* y *T.pyogenes* puede lograr evitar la metritis puerperal durante la primera lactación de vacas lecheras, lo que conduce a mejor rendimiento reproductivo.

Materiales y métodos. Componentes bacterianos inactivados. Para este ejemplo se utilizaron cepas de 4612-2 y 12714-2 de *E. coli*. Las cepas se cultivaron aeróbicamente en caldo Luria-Bertani (LB) (Sigma-Aldrich) a 37°C. Se inocularon con 1% de un cultivo durante la noche y se cultivaron en 800 ml de medio, con agitación (150 rpm). Para la cepa 12714-2, se recogieron células a las 4 h, con una DO_{600} de 0.432 y 1.0 x 10^9 UFC/ml; para la cepa 4612-2, se recogieron células a las 3.5 h, DO_{600} de 0.473 y 1.2 x 10^9 UFC/ml. Los cultivos se inactivaron con formalina al 0.1% durante 12 h, y las células se concentraron 4 veces (volumen final de 200 ml), por lo que estarían presentes 0,25 ml de cada cepa en la formulación final de la vacuna, con aproximadamente 10^9 UFC por dosis.

Las cepas 10481-8 y 6375-1 de Trueperella pyogenes se aislaron de la luz uterina de vacas lecheras. Se cultivaron las cepas en VersaTREK REDOX 1 (TREK Diagnostic Systems, OH) en el CO_2 al 7% a 37°C. Se recogieron células a las 48 h, con 1.3 x 10^8 y 0.5 x 10^8 CFU/ml para las cepas 10481-8 y 6375-1, respectivamente. Los cultivos se inactivaron con formalina al 0,1% durante 12 h, y se añadió 1 ml de cada cepa a la formulación final de la vacuna, con aproximadamente 10^8 UFC por dosis.

Se aislaron cepas 5663 y 513 de *Fusobacterium necrophorum* de la luz uterina de vacas lecheras. Las cepas se cultivaron en VersaTREK REDOX 2 (Trek Diagnostic Systems, OH) en medio anaerobio a 37°C. Todos los cultivos se inactivaron con formalina al 0.1% durante 12 h antes de concentrar las células. Las células se recogieron a las 12 h, con 1.6 x 10^{12} y 1.8 x 10^{12} CFU/ml para las cepas 513 y 5663, respectivamente. Los cultivos se inactivaron con

formalina al 0.1% durante 12 h, y se añadieron 0.01 ml de cada cepa a la formulación final de la vacuna, con aproximadamente 10^{10} UFC por dosis.

Expresión de proteínas recombinantes y purificación. *Crecimiento de cepas bacterianas y condiciones de inducción*. Se cultivó *E. coli* TOP 10 (Invitrogen, NY) en LB con agar-agar o en caldo LB (Sigma-Aldrich, MO) a 37°C. Se añadió ampicilina (50 µg/ml) según corresponda. Se cultivó *T. pyogenes* 49698 (American Type Culture Collection, VA) en de infusión de cerebro y corazón (BHI) con agar o en caldo BHI (BD de BBL, MD) enriquecido con sangre de caballo desfibrinada al 5% a 37°C y CO_2 al 7%.

Para la preparación de proteínas marcadas con His (His-PLO o FimHi-156-His), se cultivaron cultivos apropiados *de E. coli* a 37°C con agitación (200 rpm) hasta una densidad óptica a 600 nm de ~0.6. En este momento, se añadió isopropil 1-tio-β-D-galactopiranósido (IPTG; Sigma) a los cultivos a 1 mM, que se siguieron incubando con agitación durante al menos 3 h.

Manipulación de ADN y montajes. Se realizaron procedimientos convencionales para la transformación de *E. coli* y la extracción de plásmidos, restricción de ADN, ligadura y la electroforesis en gel de agarosa. Los cebadores se sintetizaron por IDT y las PCR se realizaron en un GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, CA). Para confirmar que no se introducían mutaciones por PCR, todos los montajes de ADN se secuenciaron utilizando un secuenciador automático de ADN (Cornell Biotechnology Resource Center, NY) y se analizaron utilizando Software LaserGene (DNASTAR, WI).

Clonación y purificación de His-PLO biotecnológico. El gen *PLO*, que carece de la región de codificación para la secuencia de señal predicha, se amplificó en ADN genómico ATCC49698 de *A. pyogenes* por PCR con un cebador 5' que contenía una secuencia *Xho*I (5'-ACAGCATCCTCGAGTGCCGGATTGGGAAAC-3' (SEQ ID nº: 11)) y un cebador 3' que contiene una secuencia *Eco*RI (5'-TGGAATTCCCTAGGATTTGACATTGT-3' (SEQ ID nº: 12)). La reacción de 50 µl contenía 1x tampón de amplificación Pfx (Invitrogen) con $MgSO_4$ 1 mM (Invitrogen, NY), 0,3 mM de cada dNTP, 0,3 µM de cada cebador, 1 de Platinum Pfx U DNA polymerase (Invitrogen, NY) y aproximadamente 50 ng de plantilla de ADN. Los parámetros de ciclación para la amplificación fueron: Desnaturalización inicial durante 5 min a 94°C, seguida de 30 ciclos de desnaturalización (94°C durante 1 min), hibridación (58°C durante 1 min), ampliación (72°C durante 3 min).), y una ampliación final a 72°C durante 7 min. El amplicón de 1.5 kb se digirió con *Xho*I-*Eco*RI y se clonó en pTrcHisB digerido con *Xho*I-*Eco*RI (Invitrogen, NY).

Después de 3 h de inducción, las células se recogieron por centrifugación a 10.000 × g durante 10 minutos y el sedimento se volvió a poner en suspensión en 1 × tampón de extracción/lavado (fosfato de sodio 50 mM, NaCl 300 mM) (pH 7,0). Se añadió lisozima hasta una concentración final de 0.75 mg/ml y la mezcla se incubó a 4°C con agitación durante 30 min. Las células se rompieron mediante dos pases a través de una celda de presión de French (Amicon) a 20,000 psi (138 Mpa), y el material insoluble se eliminó por centrifugación a 12,000 × g durante 30 min. His-PLO se purificó de la fracción soluble con resina de afinidad metálica TALON (Clontech, CA) según las instrucciones del fabricante. La fracción de proteína pura aislada se concentró utilizando un sistema de concentración/desalinización de fibra usando un filtro con una exclusión de peso molecular de 10 kDa (Amicon ultra 100K, Millipore, MA) y se sometió a SDS-PAGE (15%) utilizando el sistema de electroforesis Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, CA), siguiendo protocolos convencionales. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford.

Se cultivaron un total de 30 litros de cultivo para producir un total de 321.24 mg de His-PLO. El volumen final de His-PLO fue de 41 ml y la concentración final fue de 7.83 mg/ml.

Clonación y purificación de $FimH_{1-156}$-His biotecnológico. La parte del gen *FimH* que codifica el péptido señal y los primeros 156 aminoácidos (el dominio de lectina de unión a manosa, LD) de la proteína madura se amplificó a partir del plásmido pET-22b(+)- F3-LD, proporcionado por el Dr. Evgeni Sokurenko, Universidad de Washington, WA. El cebador 5' utilizado contenía una secuencia *Bam*HI (5'-CGCGGATCCATGAAACGTGTTATTACCCTG-3' (SEQ ID nº: 13)) y el cebador 3' contenía una secuencia *Hind*III (5'-CCCAAGCTTCTAGTGATGGTGATGGTGATGGCCGCCAGTAGGC ACCAC-3' (SEQ ID nº: 14) y una etiqueta de seis histidinas después de la secuencia auténtica de la proteína. Los componentes de la PCR fueron los descritos para la amplificación del gen PLO. Los parámetros de ciclación para la amplificación fueron: desnaturalización inicial durante 5 min a 94°C, seguida de 25 ciclos de desnaturalización (94°C durante 1 min), hibridación (61°C durante 1 min), ampliación (72°C durante 3 min).), y una ampliación final a 72°C durante 7 min. El amplicón, de aproximadamente 0.6 kb, se digirió con *Bam*HI-*Hind*III y se clonó en pTrcHisA (Invitrogen) digerido con *Bam*HI-*Hind*III. Después de 5 h de inducción, se realizó la purificación de $FimH_{1-156}$-His como se describe para *OLP*.

Se cultivaron un total de 92 litros de cultivo para producir 216.34 mg de $FimH_{1-156}$-His. El volumen final de $FimH_{1-156}$-His fue de 172.5 ml y la concentración fue de 1.25 mg/ml.

Cultivo concentrado sobrenadante y purificación por afinidad de leucotoxina. La cepa 6586 de *F. necrophorum* se cultivó en VersaTREK REDOX 2 durante 12 h en medio anaerobio a 37°C. El sobrenadante de cultivo se concentró a 4ºC en un sistema de concentración/desalinización de fibra hueca que utiliza un filtro con una exclusión de peso molecular de 100 kDa (Amicon ultra 100K, Millipore, MA). La purificación por afinidad de LKT se realizó para evaluar

la concentración de LKT en el sobrenadante concentrado de cultivo de 6586 de *F. necrophorum*. En resumen, el mAb F7B10 purificado (3,5 mg) se acopló a 5 ml de soporte de afinidad Affi-Gel 10 (Bio-Rad, CA) y se rellenó en una columna de 1 x 20 cm. El sobrenadante concentrado de cultivo de 6586 de *F. necrophorum* se aplicó a la columna, y los materiales no ligantes se eliminaron pasando 15 ml de NaCl 0,5 M en PBS a través de la columna. La LKT purificada se eluyó con glicina-HCl 0.2 M (pH 3.0), se neutralizó inmediatamente con NaOH y se lavó y se concentró usando un Amicon ultra 10K. La pureza de la toxina se determinó mediante SDS-PAGE.

Se cultivó un total de 10 l de 6586 de *F. necrophorum* para producir 220 ml de sobrenadante concentrado que contenía 0.186 mg/ml de LKT. La presencia y concentración de LKT en el sobrenadante concentrado se determinó por purificación por afinidad.

Formulación de vacuna. Se prepararon cinco formulaciones de vacunas diferentes: tres vacunas subcutáneas (Vacunas 1-3) y dos vacunas intravaginales (Vacunas 4-5). La vacuna 1 estaba compuesta de células bacterianas completas inactivadas (*E. coli*, *T. pyogenes* y *F. necrophorum*) y proteínas (FimH, PLO y LKT); la vacuna 2 estaba compuesta solo de proteínas (FimH, PLO y LKT); y la vacuna 3 estaba compuesta solo por células bacterianas completas inactivadas (*E. coli*, *T. pyogenes* y *F. necrophorum*). La vacuna 4 estaba compuesta por células bacterianas completas inactivadas (*E. coli*, *T. pyogenes* y *F. necrophorum*) y proteínas (FimH, PLO y LKT), y la vacuna 5 estaba compuesta solo de proteínas (PLO y LKT). El adyuvante para las vacunas subcutáneas fue hidróxido de aluminio (Rehydragel HPA, General Chemical, NJ). El volumen de adyuvante utilizado en las vacunas subcutáneas fue el 25% del volumen final de la vacuna. Se añadió hidróxido de aluminio a cada componente por separado, y se agitó suavemente durante la noche. El adyuvante para las vacunas intravaginales fue de 20 µg/dosis de toxina del cólera (List Biological Laboratories, Inc., CA).

Todos los componentes de vacunas se probaron para determinar su esterilidad antes de reunir y envasar la vacuna final. La esterilidad se evaluó cultivando 100 µl de componente de vacuna aeróbicamente en caldo LB, en medio aerobio en 7% de CO_2 en VersaTREK REDOX 1 y en medio anaerobio en VersaTREK REDOX 2 a 37°C durante 48 h. Los componentes se consideraron contaminados si había crecimiento bacteriano en cualquiera de los tres medios de cultivo al final del período de incubación.

La evaluación de las concentraciones de endotoxinas se realizó utilizando el LAL Endpoint Assay (Hycult Biotech, Países Bajos) siguiendo las instrucciones del fabricante. Todas las formulaciones de vacunas tenían concentraciones de endotoxinas por debajo de 10^5 UE/ml.

Granja y gestión. El ensayo de campo se realizó en una granja lechera comercial situada cerca de Ithaca, Nueva York. Las vacas se inscribieron del 24 de mayo de 2012 al 16 de agosto de 2012; el período de seguimiento continuó hasta el 30 de abril de 2013. Esta granja fue seleccionada debido a su larga relación de trabajo con la Clínica de Medicina Ambulatoria y de Producción en la Universidad de Cornell. El protocolo de investigación fue revisado y aprobado por el Comité Institucional de Animal Care and Use Committee de la Universidad de Cornell (número de protocolo: 2011-0111). La granja ordeñó 3,300 vacas Holstein 3 veces al día en una sala de ordeño paralela de 52 establos. Las vacas fueron alojadas en cobertizos con establos abiertos con establos de hormigón cubiertos con colchones y con lechos con sólidos de estiércol. A todas las vacas se les ofreció una ración mixta total (TMR) que consistía en aproximadamente 55% de forraje (ensilado de maíz, heno, y paja de trigo) y 45% de concentrado (harina de maíz, harina de soja, canola, semilla de algodón y pulpa de cítricos) referido a la materia seca de la dieta. La dieta fue formulada para cumplir o exceder los requisitos de nutrientes de NRC para vacas Holstein lactantes que pesan 650 kg y producen 45 kg de leche con un 3.5% de grasa corregida. La gestión reproductiva utilizó una combinación de Presynch, Ovsynch, Resynch y detección de estro, con 25% a 30% de vacas criadas por inseminación artificial cronometrada y el resto criado después de la detección de estro únicamente mediante monitores de actividad (ALPRO; DeLaval, Kansas City , MO).

Grupos de tratamiento y definición de caso. Se inscribieron semanalmente terneras preñadas tardías; los criterios de inclusión para la inscripción fueron: 230 ± 3 días de gestación, 629 a 734 días de edad y del estado corporal (BCS) mayor de 2.5. Las terneras que eran visualmente cojas no se incluyeron en el estudio. Se utilizó un diseño de ensayo de campo aleatorizado total; las terneras se asignaron al azar en uno de los seis grupos de tratamiento diferentes utilizando la función de números aleatorios de Excel (Microsoft, Redmond, MA). Un total de 371 terneras preñadas se inscribieron en el estudio; 105, 54, 54, 53, 53 y 53 terneras fueron asignadas al azar a los grupos referencia, Vacuna 1, Vacuna 2, Vacuna 3, Vacuna 4 y Vacuna 5, respectivamente. Las terneras asignadas a los grupos de vacunas recibieron dos dosis de vacuna: a los 230 ± 3 días de gestación y 260 ± 3 días de gestación.

Las puntuaciones de estado corporal se determinaron para todas las vacas del estudio a los 230 ± 3 días de gestación, 260 ± 3 días de gestación, 2 ± 1 días en lactación (DEL), 6 ± 1 DEL y a 35 ± 3 DEL por un único investigador a ciegas al grupo de tratamiento utilizando una escala de cinco puntos con un sistema de un cuarto de punto. Para obtener muestras de suero, se extrajo sangre de una vena/arteria coccígea utilizando un tubo Vacutainer sin anticoagulante y una aguja Vacutainer de calibre 20 x 2.54 cm (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ). Todas las muestras de sangre se transportaron al laboratorio en hielo y se centrifugaron en una centrifugadora a 2,000 × g durante 15 min a 4°C; el suero se recogió y se congeló a - 80°C. Las muestras de suero se recogieron a los 230 ± 3 días de gestación, 260 ± 3 días de gestación, 1 ± 2 DEL, 6 ± 1 DEL y 35 ± 3 DEL.

Se recogieron hisopos cervicouterinos a 2 ± 1 DEL y 6 ± 1 DEL; se ató a las vacas y el área del perineo se limpió y desinfectó con una solución de etanol al 70%. El hisopo se manipuló dentro del cuello uterino y se expuso a la secreción uterina. Los hisopos se mantuvieron dentro de un vial estéril a 4°C hasta que se procesaron en el laboratorio. Los hisopos recogidos a 2 ± 1 DEL se cultivaron aeróbicamente en Chromagar (Difco) a 37°C y las colonias de *E. coli* se distinguieron por un color azul; los hisopos recolectados a 6 ± 1 DEL se cultivaron en medio anaerobio en LKV agar (Anaerobe Systems) y las colonias de *F. necrophorum* se diferenciaron por morfología.

El personal capacitado de la granja diagnosticó y trató la retención de placenta, la metritis puerperal, la cetosis y la mastitis clínica, que siguieron un protocolo de diagnóstico específico diseñado por los veterinarios de la Clínica de Medicina Ambulatoria y de Producción de la Universidad de Cornell. Los tratamientos eran a ciegas para el personal de la granja.

Después del parto, las vacas se mantuvieron en el mismo establo hasta alrededor de 20 DEL. Este establo fue supervisado de forma intensiva por los empleados de la granja, y las vacas se sometieron a un examen físico completo si presentaban signos de torpeza y depresión; a las vacas con flujo uterino fétido, acuoso, de color marrón rojizo acompañado de fiebre se les diagnosticó metritis puerperal y fueron tratadas por empleados de la granja. La retención de placenta se definió como una enfermedad en la que las vacas no podían liberar sus membranas fetales en las 24 h posteriores al parto. El diagnóstico de metritis puerperal por el equipo de investigación se realizó en 6 ± 1 DEL. La metritis puerperal se definió como la presencia de flujo uterino fétido, acuoso, de color marrón rojizo y una temperatura rectal superior a 39,5°C. La información sobre el diagnóstico de metritis puerperal no se intercambió entre el personal de la granja y el equipo de investigación. Los datos sobre los rasgos sanitarios y la reproducción se extrajeron de la base de datos DairyComp 305® de la granja(Valley Agricultural Software, Tulare, CA).

El diagnóstico de endometritis clínica se evaluó en 35 ± 3 DEL por inspección visual de una muestra de lavado uterino por la presencia de secreción purulenta. Para obtener muestras de lavado uterino, se ataron las vacas, se limpió y desinfectó el área del perineo con etanol al 70% y se introdujo una pipeta de infusión de plástico en la vagina superior y se manipuló a través del cuello uterino hasta el útero. Se infundió un total de 20 ml de solución salina estéril en el útero, se agitó suavemente, y se aspiró una muestra del líquido. El volumen de líquido recuperado osciló entre 5 y 15 ml. Un investigador puntuó visualmente todas las muestras, y evaluó la presencia de una secreción purulenta o mucopurulenta en la muestra de lavado uterino. La puntuación osciló entre 0 y 2, indicando 0 ausencia de secreción purulenta o mucopurulenta, indicando 1 una muestra sangrienta pero no purulenta e indicando 2 la presencia de pus en la muestra de lavado. Las vacas con una puntuación de 2 se consideraron diagnosticadas con endometritis clínica. Las muestras se mantuvieron en hielo hasta que se cultivaron en placas de agar-agar de Mueller-Hinton (BBL™) enriquecidas con 5% de sangre de oveja desfibrinada durante 48 h en medio aerobio en CO_2 al 5% a 38°C. Las colonias típicas de *T. pyogenes* se distinguían por la morfología de las colonias, la hemólisis posterior a la incubación y el aspecto característico en la tinción de Gram.

Ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA). En los ELISA se utilizaron porciones de los antígenos producidas para la preparación de vacunas. Las cepas de *E. coli* se agruparon como un único antígeno. Lo mismo se hizo para las cepas *de F. necrophorum* y *T. pyogenes*.

Las muestras de suero bovino se descongelaron y se mezclaron antes del análisis. Los protocolos de ELISA seleccionados fueron los siguientes. Las placas de microvaloración de ELISA (Greiner Bio-One, Alemania) se recubrieron con PBS (solución salina tamponada con fosfato 10X, pH 7.4, Ambion®) que contenía 0.295 µg/ml de $FimH_{1-156}$-His, 0.036 µg/ml de His-PLO, 0.186 µg/ml de LKT, 10^7 células/ml de *E. coli*, 10^{10} células/ml de *F. necrophorum*, y 10 células/ml de *T. pyogenes* para análisis de IgG anti-FiniH, anti-LKT, anti-PLO, anti-*E. coli*, anti-*F. necrophorum*, y anti-*T. pyogenes*, respectivamente. La unión del antígeno a los pocillos de microvaloración se llevó a cabo durante la noche a 4ºC, los sitios de unión no específicos se bloquearon con PBS que contenía caseína al 1% (Thermo Scientific, Rockford, IL). Luego se agregaron diluciones de muestras de suero bovino a las placas ELISA; las muestras de suero se diluyeron en proporciones de 1:1000, 1:5000, 1:5000, 1:150, 1:500 y 1:150 para análisis de IgG anti-FimH, anti-LKT, anti-PLO, anti-*E. coli*, anti-*F. necrophorum*, y anti-*T. pyogenes*, respectivamente. Las concentraciones óptimas de antígeno y anticuerpo se determinaron realizando el protocolo ELISA cuantitativo con concentraciones variables. El anticuerpo específico para el serotipo unido a la placa ELISA se detectó con un anticuerpo anti-IgG bovino conjugado con peroxidasa de rábano picante, diluido según las instrucciones del fabricante (Sigma Aldrich, St. Louis, MO), seguido de la adición del sustrato, 3,3',5,5'- tetrametilbencidina-TMB (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). La densidad óptica de cada pocillo se midió después de 20 min a 650 nm utilizando un lector de placas ELISA (Synergy HTmicroplate reader BioTek Instruments, VT). La cantidad de color producida era proporcional a la cantidad de anticuerpo primario unido a las proteínas en el fondo de los pocillos. Entre cada paso del análisis, los pocillos de microvaloración se aspiraron y se enjuagaron 3 veces con solución de lavado (1 × solución salina tamponada con fosfato Tween-20).

Análisis estadísticos. El análisis estadístico descriptivo se realizó en SAS utilizando el procedimiento FREQ (SAS Institute INC., Cary, NC). Para evaluar el efecto de la vacunación sobre las probabilidades de RDPMET, FDPMET, endometritis, y resultado de los cultivos de *E. coli*, *F. necrophorum T. pyogenes*, se ajustaron modelos de regresión logística en SAS utilizando el procedimiento logístico. El efecto de las vacunas subcutáneas e intravaginales en la reproducción se analizó por el riesgo proporcional de Cox utilizando el procedimiento de regresión de riesgos proporcionales en SAS. Para evaluar el efecto de la vacunación sobre la temperatura rectal a 6 ± 1 DEL, se

ajustaron modelos lineales generales mixtos a los datos utilizando JMP®PRO9. Para evaluar el efecto de la vacunación sobre ELISA que detecta la IgG sérica frente a antígenos de vacunas, se ajustaron modelos lineales generales mixtos a los datos utilizando JMP®PRO9. Para todos los modelos descritos anteriormente, las variables independientes y sus respectivas interacciones se mantuvieron cuando P <0.10 en un intento de reducir el riesgo de error de tipo II mientras se mantenía un riesgo de error de tipo I estricto del 5%. El *tratamiento* variable se forzó en todos los modelos estadísticos incluso en ausencia de significación estadística. La edad en días en la inscripción y BCS en la inscripción se ofrecieron a todos los modelos.

Usando los materiales y métodos descritos anteriormente en este ejemplo, se obtuvieron los resultados siguientes.

Estadística descriptiva. La estadística descriptiva con respecto a la edad media en el momento de la inscripción (días), el BCS medio en la inscripción y 6 ± 1 días después del parto, la duración media de la gestación en la inscripción y el número total de animales inscritos se presentan en la tabla 5. Sólo las terneras preñadas se inscribieron en este estudio, permitiendo tener tan poca variación entre animales como sea posible.

Tabla 5: Estadística descriptiva de grupos de tratamiento

	Referencia	Vacuna 1	Vacuna 2	Vacuna 3	Vacuna 4	Vacuna 5
Edad media (días) en la inscripción (± SE)	664 (3.72)	655 (5.2)	665 (5.24)	669 (5.24)	666 (5.24)	668 (5.24)
Puntuación media de la enfermedad corporal en la inscripción (± SE)	3.71 (0.03)	3.76 (0.05)	3.74 (0.05)	3.65 (0.05)	3.72 (0.05)	3.66 (0.05)
Puntuación media de la enfermedad corporal en 6 ± 1 (± SE)	3.5 (0.02)	3.49 (0.03)	3.52 (0.03)	3.49 (0.03)	3.44 (0.03)	3.50 (0.03)
Promedio de días de gestación en la inscripción (± SE)	230 (0.21)	230 (0.29)	230 (0.29)	230 (0.29)	230 (0.29)	230 (0.29)
Animales totales inscritos	105	54	53	53	53	53

Efecto de la vacunación sobre la incidencia de metritis puerperal diagnosticada por un investigador (RDPMET), metritis puerperal diagnosticada en la granja (FDPMET) y temperatura rectal en 6 ± 1 DEL. El efecto de la vacunación en la incidencia de RDPMET se presenta en la tabla 6. Cuando se evaluaron por separado, las vacunas 1, 2 y 3 se relacionaron con reducciones numéricas en la incidencia de RDPMET, mientras que las vacunas 4 y 5 se relacionaron con un aumento de incidencias. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (valor *P* = 0.21). Cuando las vacunas se evaluaron agrupadas como vacunas subcutáneas o intravaginales, las vacunas subcutáneas se relacionaron con una reducción significativa en la incidencia de RDPMET (valor P = 0,03).

Tabla 6: Efectos de diferentes formulaciones de vacunas sobre la incidencia de metritis puerperal diagnosticada por el investigador. Las vacunas se evaluaron por separado en el Modelo 1 y se agruparon en el Modelo 2. La edad en días y la puntuación del estado corporal al momento de la inscripción se ofrecieron a ambos modelos

Modelo y variables	Incidencia de metritis puerperal (%)	Coeficientes (SE)	Relación de probabilidades (95% CI)	Valor *P*
Modelo 1				
Referencia	12.12	Ref.	valor inicial	
Vacuna 1	6.25	-0.14 (0.55)	0.48 (0.13 – 1.80)	
Vacuna 2	4.08	-0.59 (0.64)	0.31 (0.07 – 1.44)	
Vacuna 3	2.04	-1.30 (0.86)	0.15 (0.02 – 1.20)	0.21
Vacuna 4	13.46	0.70 (0.42)	1.13 (0.41 – 3.01)	
Vacuna 5	14.00	0.75 (0.42)	1.18 (0.43 – 3.21)	
Intercepción		-2.56 (0.25)		

Modelo 2				
Referencia	12.12	Ref.	valor inicial	
Subcutáneo	4.11	-0.83 (0.31)	0.31 (0.11 – 0.86)	0.03
Intravaginal	13.73	0.48 (0.26)	0.15 (0.50 – 2.63)	
Intercepción		-2.32 (0.20)		

El efecto de la vacunación sobre la incidencia de FDPMET está presente en la tabla 7. Cuando las vacunas se evaluaron por separado, la incidencia de FDPMET tendió a ser diferente entre los tratamientos (valor *P* = 0.064). Además, cuando las vacunas se evaluaron agrupadas como vacunas subcutáneas o intravaginales, las vacunas subcutáneas se relacionaron con una probabilidad significativamente menor de FDPMET (valor *P* = 0.047).

Tabla 7: Efectos de diferentes formulaciones de vacunas sobre la incidencia de metritis puerperal diagnosticada en la granja. Las vacunas se evaluaron por separado en el Modelo 1 y se agruparon en el Modelo 2. La edad en días y la puntuación del estado corporal al momento de la inscripción se ofrecieron a ambos modelos

Modelo y variables	Incidencia de metritis puerperal (%)	Coeficientes (SE)	Relación de probabilidades (95% CI)	Valor *P*
Modelo 1				
Referencia	27.62	Ref.	valor inicial	
Vacuna 1	11.11	-0.73 (0.38)	0.33 (0.13 – 0.85)	
Vacuna 2	16.98	-0.24 (0.33)	0.54 (0.23 – 1.23)	
Vacuna 3	20.75	0.005 (0.31)	0.69 (0.31 – 1.51)	0.064
Vacuna 4	33.96	0.68 (0.27)	1.35 (0.66 – 2.74)	
Vacuna 5	19.23	-0.09 (0.32)	0.62 (0.28 – 1.40)	
Intercepción		-1.34 (0.14)		
Modelo 2				
Referencia	27.62	Ref.	valor inicial	
Subcutáneo	16.25	-0.43 (0.18)	0.51 (0.28 – 0.93)	0.047
Intravaginal	26.67	0.19 (0.18)	0.95 (0.52 – 1.75)	
Intercepción		-1.20 (0.12)		

El efecto de la vacunación sobre la temperatura rectal en 6 ± 1 DEL se presenta en la figura 3. La temperatura rectal no fue estadísticamente diferente entre los grupos de tratamiento cuando las vacunas se evaluaron por separado (valor *P* = 0.14). Sin embargo, la temperatura rectal fue estadísticamente diferente entre los grupos de tratamiento cuando las vacunas se evaluaron agrupadas como referencia, vacunas subcutáneas o vacunas intravaginales (valor *P* = 0.018). La vacunación subcutánea se asoció a una reducción significativa de la temperatura rectal en 6 ± 1 DEL.

Efecto de la vacunación sobre la incidencia de endometritis y resultados del cultivo de secreción uterina. Las vacunas no fueron eficaces para prevenir la endometritis, cuando se evaluaron por separado o cuando se agruparon como vacunas subcutáneas e intravaginales (valor *P* = 0.99). La incidencia de la endometritis fue de 8.57%, 7.89%, 12.12%, 7.50%, 9.09% y 9.76% para la referencia, vacuna 1, vacuna 2, vacuna 3, vacuna 4 y vacuna 5, respectivamente. La incidencia de la endometritis fue de 9.01% y 9.46% para vacunas subcutáneas e intravaginales, respectivamente. Además, no hubo un efecto significativo de la vacunación sobre la probabilidad de contaminación bacteriana intrauterina (Tabla 8).

Tabla 8: Efectos de diferentes formulaciones de vacunas sobre la incidencia de *Escherichia coli* intrauterina en 2 ± 1 DEL, *Fusobacterium necrophorum* en 6 ± 1 DEL y *Trueperella pyogenes* en 35 ± 3 DEL. Las vacunas se evaluaron por separado en el Modelo 1, el Modelo 3 y el Modelo 5; y se agruparon en el modelo 2, modelo 4 y modelo 6. La edad en días y la puntuación del estado corporal al momento de la inscripción se ofrecieron a todos los modelos

Modelo y variables	Vacas positivas para cultivo intrauterino (%)	Coeficientes (SE)	Relación de probabilidades (95% CI)	Valor *P*
Modelo 1	*E. coli*			
Referencia	55.00	Ref.	valor inicial	
Vacuna 1	47.06	-0.02 (0.25)	0.75 (0.38 – 1.48)	
Vacuna 2	46.15	-0.06 (0.25)	0.72 (0.36 – 1.41)	
Vacuna 3	40.38	-0.35 (0.26)	0.54 (0.24 – 1.06)	0.63
Vacuna 4	50.94	0.12 (0.25)	0.86 (0.44 – 1.68)	
Vacuna 5	50.00	0.04 (0.26)	0.80 (0.40 – 1.58)	
Intercepción		1.96 (1.13)		
Modelo 2	*E. coli*			
Referencia	55.00	Ref.	valor inicial	
Subcutáneo	44.52	-0.21 (0.14)	0.66 (0.40 – 1.10)	0.26
Intravaginal	50.49	0.01 (0.16)	0.83 (0.48 – 1.44)	
Intercepción				
Modelo 3	*F. necrophorum*			
Referencia	48.98	Ref.	valor inicial	
Vacuna 1	36.00	-0.39 (0.26)	0.59 (0.29 – 1.18)	
Vacuna 2	48.00	0.11 (0.26)	0.96 (0.49 – 1.90)	
Vacuna 3	48.00	0.11 (0.26)	0.96 (0.49 – 1.90)	0.76
Vacuna 4	47.17	0.07 (0.25)	0.93 (0.48 – 1.81)	
Vacuna 5	44.00	-0.05 (0.26)	0.82 (0.41 – 1.62)	
Intercepción		-0.19 (0.11)		
Modelo 4	*F. necrophorum*			
Referencia	48.98	Ref.	valor inicial	
Subcutáneo	44.00	-0.09 (0.14)	0.82 (0.49 – 1.36)	0.74
Intravaginal	45.63	-0.02 (0.16)	0.87 (0.50 – 1.52)	
Intercepción		-0.15 (0.11)		
Modelo 5	*T. pyogenes*			
Referencia	14.49	Ref.	valor inicial	
Vacuna 1	5.26	-0.80 (0.63)	0.30 (0.06 – 1.46)	
Vacuna 2	21.21	0.77 (0.42)	1.44 (0.48 – 4.32)	
Vacuna 3	12.50	0.05 (0.46)	0.70 (0.21 – 2.30)	0.37
Vacuna 4	12.12	0.06 (0.50)	0.70 (0.20 – 2.52)	
Vacuna 5	7.32	-0.49 (0.54)	0.41 (0.10 – 1.61)	
Intercepción		-16.55 (5.48)		
Modelo 6	*T. pyogenes*			
Referencia	14.49	Ref.	valor inicial	
Subcutáneo	12.61	0.01 (0.26)	0.74 (0.30 – 1.82)	0.50
Intravaginal	9.46	-0.32 (0.31)	0.53 (0.19 – 1.53)	
Intercepción		-16.66 (5.48)		

Efecto de la vacunación en la reproducción. Era 1.36 veces más probable que las vacas que recibieron vacunación subcutánea concebieran en comparación con las vacas de referencia (valor *P* = 0.04). Sin embargo, para las vacas que recibieron vacunas intravaginales, la probabilidad de concebir no fue estadísticamente diferente de las vacas de referencia (relación de riesgo = 1.12, valor *P* = 0.46). La edad en días en el momento de la inscripción y el BCS en la inscripción se mantuvieron en el modelo para este análisis (valor *P* = 0.02 y 0.01, respectivamente). La mejora en el rendimiento reproductivo se ilustra además mediante el análisis de supervivencia (Figura 5) que demuestra que las vacas vacunadas con vacunas subcutáneas quedaron preñadas significativamente más rápido que las vacas de referencia y las vacas que recibieron vacunación intravaginal.

Respuestas serológicas a la vacunación. El efecto de la vacunación en la IgG sérica detectada por ELISA contra varios antígenos se presenta en la figura 4. En general, la vacunación produjo un aumento significativo en los valores de IgG sérica contra todos los antígenos; la vacunación subcutánea fue más eficaz para aumentar los valores de IgG sérica que la vacunación intravaginal.

La figura 5 muestra un ejemplo de análisis de supervivencia de Kaplan-Meier del intervalo parto a concepción por tratamiento agrupado como referencia, vacunas subcutáneas y vacunas intravaginales. Las administraciones de vacunación fueron: referencia (sin vacuna), vacunas subcutáneas (vacunas 1, 2 y 3 combinadas) y vacuna intravaginal (vacunas 4 y 5 combinadas). El eje Y es el% de vacas no preñadas y el eje X son los días desde el parto hasta la gestación. El intervalo medio entre el parto y la concepción para vacunas subcutáneas (línea interna interrumpida), vacunas intravaginales (línea media interrumpida) y referencia (línea continua) fue de 94, 114 y 120 respectivamente. (valor *P* = 0.04). La pendiente de la línea que representa la vacuna subcutánea es la más pendiente y demuestra que un número creciente de vacas quedaron preñadas en el grupo de vacuna subcutánea en comparación con los grupos de vacuna intravaginal y de referencia.

Como se verá a partir de los resultados anteriores presentados en este ejemplo, los efectos de 5 formulaciones de vacunas diferentes (3 vacunas subcutáneas y 2 vacunas intravaginales) contienen diferentes combinaciones de proteínas (FimH, leucotoxina de *F. necrophorum* (LKT), piolisina de T. pyogenes (PLO) y células completas inactivadas (*E. coli*, *F. necrophorum* y *T. pyogenes*) sobre la salud uterina de las vacas lecheras son diferentes en que la vacunación subcutánea disminuyó significativamente la incidencia de metritis puerperal, mientras que la vacunación intravaginal no fue eficaz.

La metritis puerperal se caracteriza por la inflamación de todo el grosor de las paredes uterinas, y se asocia a signos de enfermedad polisistémica, tales como torpeza, disminución de la producción de leche y fiebre. Cuando se diagnosticó como se describe en la presente memoria, la incidencia de la metritis puerperal fue de 12.12% y cuando fue diagnosticada por trabajadores de la granja fue de 27.62%. Esta discrepancia puede atribuirse al período durante el cual se controló a las vacas; en tanto que los trabajadores de la granja controlaron a las vacas diariamente durante sus primeros 20 días después del parto, el equipo de investigación examinó las vacas los 6 ± 1 días después del parto. Las vacas fueron examinadas en este momento debido a los picos de metritis en los primeros 7 días después del parto. Sin embargo, en general, el efecto de la vacunación en la metritis puerperal fue coherente entre el diagnóstico del grupo de investigación y el de los trabajadores de la granja; la vacunación subcutánea redujo significativamente la incidencia de metritis puerperal, mientras que la vacuna intravaginal no fue eficaz para evitar la enfermedad.

E. coli y *F. necrophorum* son bacterias gram-negativas, caracterizadas por la presencia de lipopolisacáridos (LPS) en su membrana externa, y son agentes etiológicos conocidos de la metritis puerperal; se sabe que los LPS producen un aumento de la temperatura corporal en el ganado. Aunque la vacunación no disminuyó significativamente el porcentaje de vacas que eran positivas para *E. coli* y *F. necrophorum* intrauterinas, las vacas vacunadas por vía subcutánea tuvieron una temperatura rectal inferior en 6 ± 1 DEL. Esto sugiere que, incluso en presencia de bacterias en el útero, las vacas inmunizadas tenían menos probabilidades de desarrollar signos generales causados por LPS liberados de *E. coli* y *F. necrophorum*. Se sabe que reducir la carga bacteriana de *E. coli* disminuye la gravedad de la enfermedad; por lo tanto, la inmunización disminuyó la carga de patógenos dentro del útero.

Las respuestas inmunitarias de la mucosa pueden provocarse eficazmente mediante la administración de vacunas a las superficies de la mucosa, mientras que las vacunas subcutáneas e intramusculares generalmente no provocan inmunidad de la mucosa y son menos eficaces para prevenir la infección de las superficies de la mucosa. Ya se han publicado resultados prometedores con respecto a la prevención de UTI humana por inmunización intravaginal con una vacuna de células completas. Sin embargo, se desconoce cómo la síntesis local de anticuerpos específicos por parte de las células del útero secretoras de anticuerpos contribuye a la inmunidad uterina. En el presente estudio, la inmunización intravaginal no fue eficaz en la prevención de enfermedades uterinas.

En general, la vacunación subcutánea aumentó los niveles séricos de IgG contra *E. coli*, FimH, *F. necrophorum*, LKT, *T. pyogenes* y PLO.

Se sabe que LKT de *F. necrophorum* es muy tóxica para los PMN bovinos, lo que produce su muerte mediada por

apoptosis; esta toxicidad depende de la dosis Es posible que la inmunización de las vacas contra LKT haya reducido el efecto perjudicial de esta toxina en los PMN intrauterinos, mejorando la capacidad del sistema inmunitario innato para eliminar infecciones bacterianas del útero mediante la fagocitosis. Los PMN seleccionados son piezas clave en la defensa inmunitaria del útero; la migración reducida de los PMN 2 semanas antes del parto está relacionada con la retención de placenta, y la menor actividad fagocítica y la capacidad de explosión oxidativa de los PMN están relacionadas con la aparición de metritis y endometritis.

La incidencia de la metritis puerperal disminuyó significativamente con la vacunación subcutánea antes del parto con vacunas que contenían diferentes combinaciones de proteínas (FimH, LKT, PLO) y células completas inactivadas (*E. coli*, *F. necrophorum* y *T. pyogenes*). En cambio, la vacunación intravaginal no fue eficaz en la disminución de la incidencia de metritis puerperal. Por lo tanto, una vacuna contra la metritis producida comercialmente podría convertirse en parte integral de una estrategia preventiva contra la metritis, lo que cabría esperar que redujera la incidencia de la enfermedad y redujera el uso de antibióticos, aliviando así tanto las molestias en los animales como el impacto económico negativo general de la metritis en la industria láctea.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Cornell University

<120> VACUNA PARA ENFERMEDAD INTRAUTERINA

<130> 018617.CRF-6067-02

<150> 61/731,333
<151> 2012-11-28

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 21
<212> DNA
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador de PCR

<400> 1
tcatcaacaa tccacgaaga g 21

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador de PCR

<400> 2
ttgcctccag ttgacgcttt 20

<210> 3
<211> 24
<212> DNA
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador de PCR

<400> 3
gcagggttgg tgaaagagtt tact 24

<210> 4
<211> 26
<212> DNA
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador de PCR

<400> 4
gcttgatata accttcagaa tttgca 26

<210> 5
<211> 22
<212> DNA
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador de PCR

<400> 5
cactacgctc accattcaca ag 22

<210> 6
<211> 22
<212> DNA
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador de PCR

<400> 6
gctgtaatcc gctttgtctg tg 22

<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador de PCR

<400> 7
tgcagaacgg ataagccgtg g 21

<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador de PCR

<400> 8
tgcagaacgg ataagccgtg g 21

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador de PCR

<400> 9
aatcggagta gtaggttctg 20

<210> 10
<211> 18
<212> DNA
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador de PCR

<400> 10
tttggtaact gccactgc 18

<210> 11
<211> 30
<212> DNA
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador de PCR

<400> 11
acagcatcct cgagtgccgg attgggaaac 30

<210> 12
<211> 26
<212> DNA
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador de PCR

<400> 12
tggaattccc taggatttga cattgt 26

<210> 13
<211> 30
<212> DNA
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador de PCR

<400> 13
cgcggatcca tgaaacgtgt tattaccctg 30

<210> 14
<211> 48
<212> DNA
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador de PCR

<400> 14
cccaagcttc tagtgatggt gatggtgatg gccgccagta ggcaccac 48

REIVINDICACIONES

1. Una composición veterinaria para su utilización en un método para la profilaxis de la metritis puerperal en un rumiante que comprende administrar por vía subcutánea la composición veterinaria al mamífero rumiante, la composición veterinaria que comprende proteína leucotoxina (LKT) de *F. necrophorum*, proteína adhesina de fimbrias tipo 1 (FimH) de *E. coli*, y proteína piolisina (PLO) de *T. pyogenes*.

2. La composición veterinaria para la utilización de la reivindicación 1, en donde el mamífero rumiante es una vaca lechera.

3. La composición veterinaria para la utilización de la reivindicación 2, en donde la vaca lechera es un miembro de un grupo de vacas lecheras, que comprende además la administración subcutánea de la composición veterinaria a las demás vacas lecheras en el grupo, de tal manera que se reduce la incidencia de metritis puerperal en el grupo.

4. Una composición veterinaria para su utilización como medicamento para mejorar la función reproductiva de un rumiante que comprende administrar por vía subcutánea al rumiante una composición veterinaria que comprende proteína leucotoxina (LKT) de *F. necrophorum*, proteína adhesina de fimbrias tipo 1 (FimH) de *E. coli*, y proteína piolisina (PLO) de *T. pyogenes*, de tal manera que la función reproductiva del rumiante mejora, en donde la mejora de la función reproductiva del rumiante comprende reducir un intervalo parto a concepción en relación con el intervalo de parto a concepción en un rumiante de referencia.

5. La composición veterinaria para la utilización de la reivindicación 4, en donde el rumiante es una vaca.

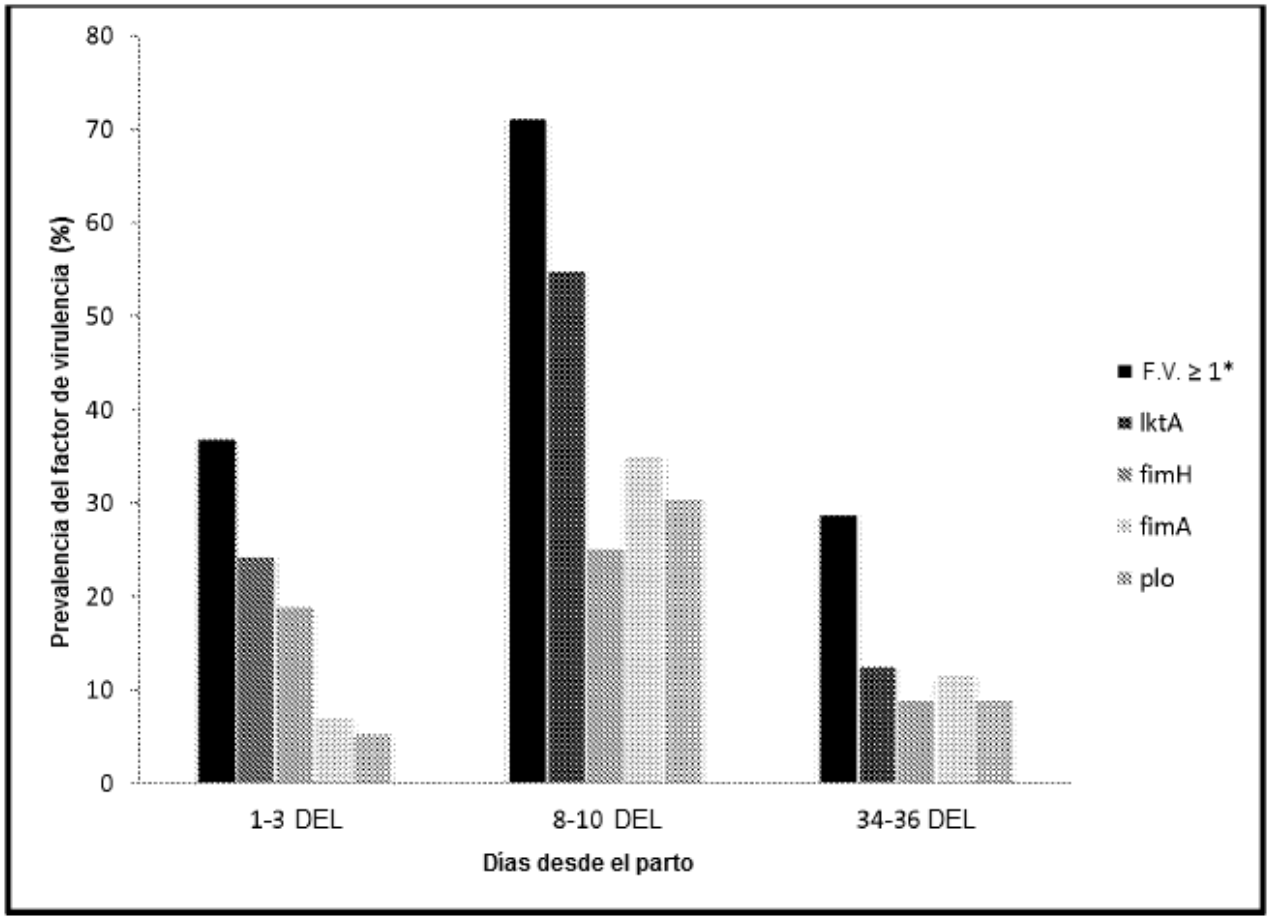

80
70
60
50
40
30
20
10
0
Prevalencia del factor de virulencia (%)
1-3 DEL
8-10 DEL
34-36 DEL
Días desde el parto
F.V. ≥ 1*
lktA
fimH
fimA
plo

Figura 1

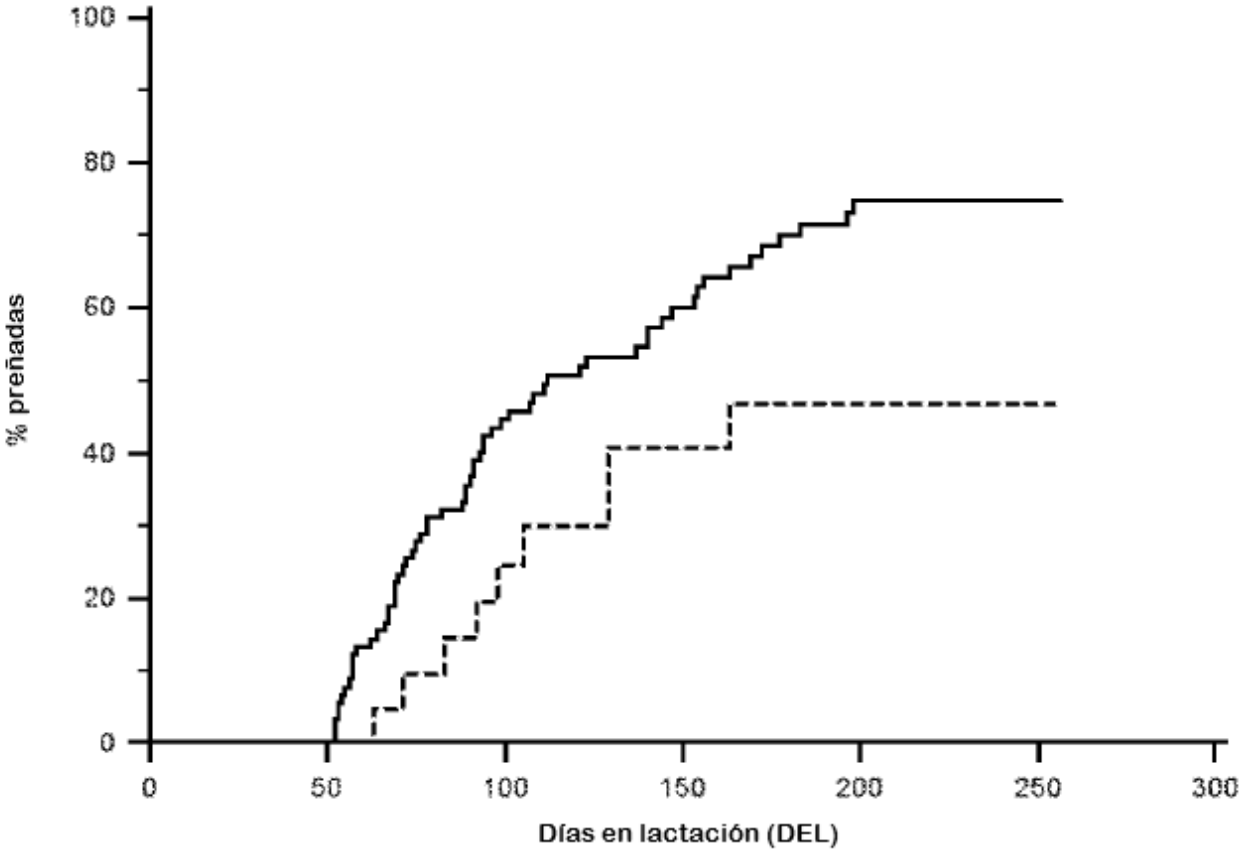

100
80
60
40
20
0
% preñadas
0
50
100
150
200
250
300
Días en lactación (DEL)

Figura 2

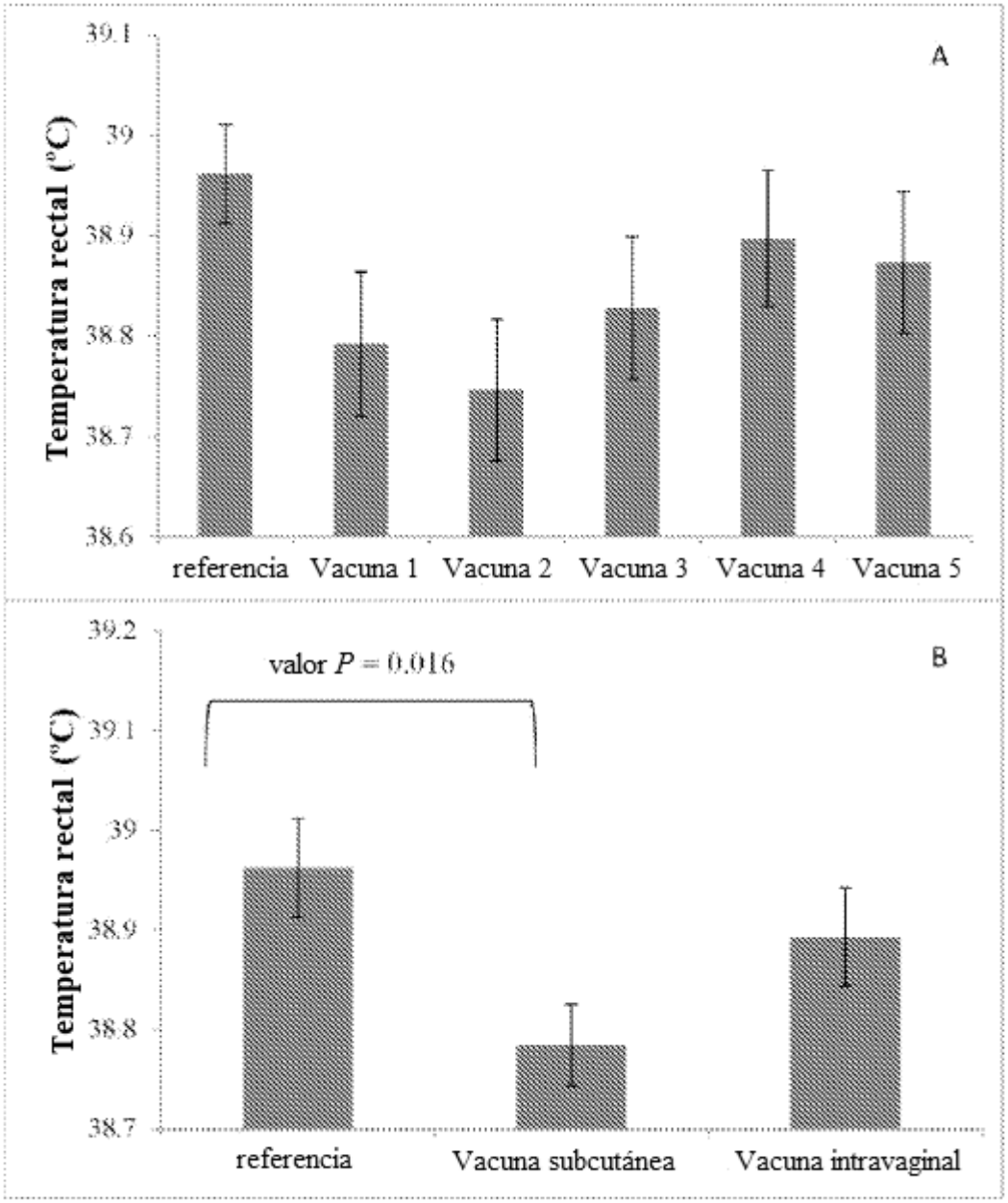

A
Temperatura rectal (°C)
39.1
39
38.9
38.8
38.7
38.6
referencia
Vacuna 1
Vacuna 2
Vacuna 3
Vacuna 4
Vacuna 5
B
valor $P = 0.016$
Temperatura rectal (°C)
39.2
39.1
39
38.9
38.8
38.7
referencia
Vacuna subcutánea
Vacuna intravaginal

Figura 3

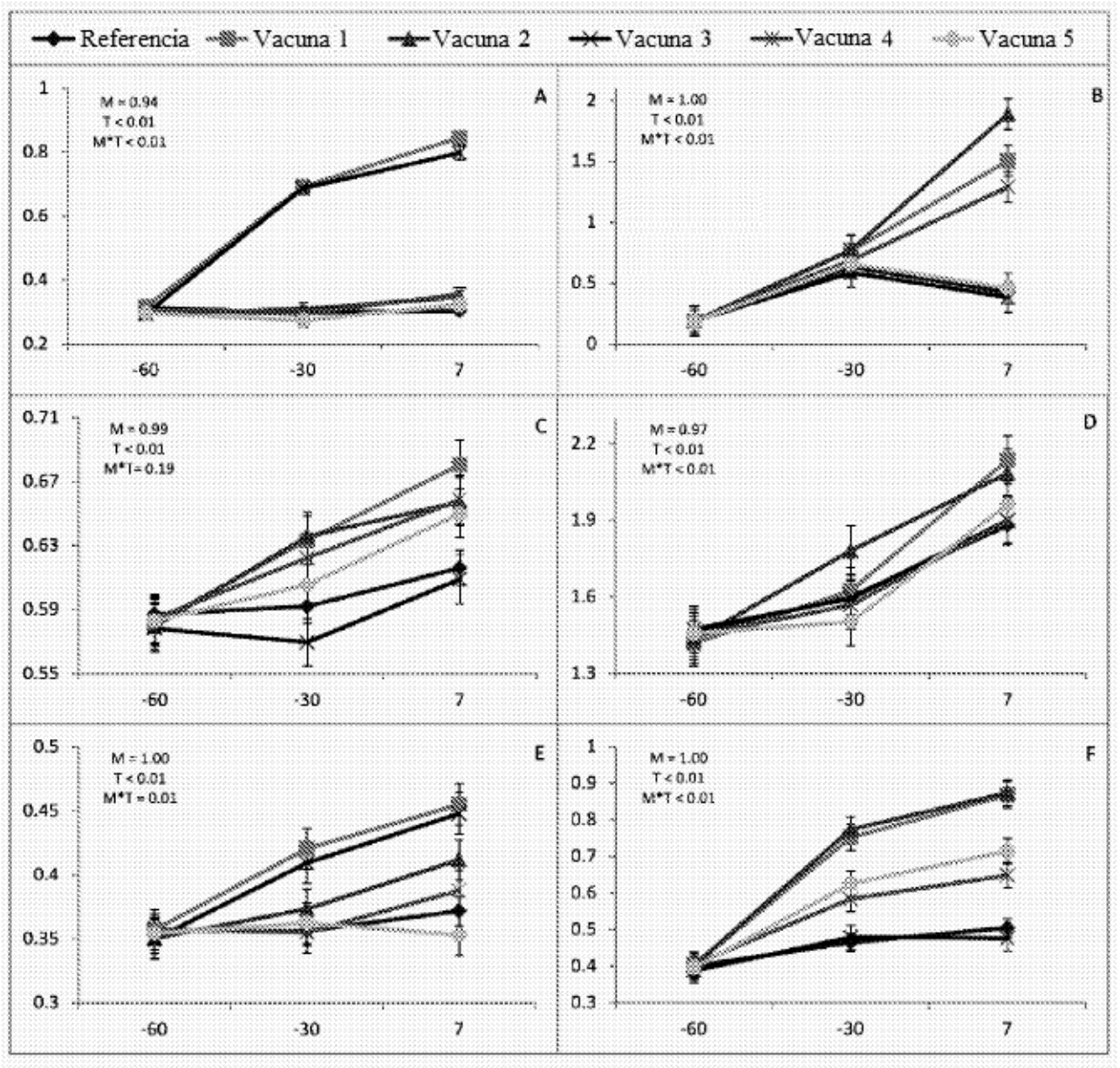

Referencia
Vacuna 1
Vacuna 2
Vacuna 3
Vacuna 4
Vacuna 5
A
M = 0.94
T < 0.01
M*T < 0.01
B
M = 1.00
T < 0.01
M*T < 0.01
C
M = 0.99
T < 0.01
M*T = 0.19
D
M = 0.97
T < 0.01
M*T < 0.01
E
M = 1.00
T < 0.01
M*T = 0.01
F
M = 1.00
T < 0.01
M*T < 0.01
-60
-30
7

Figure 4

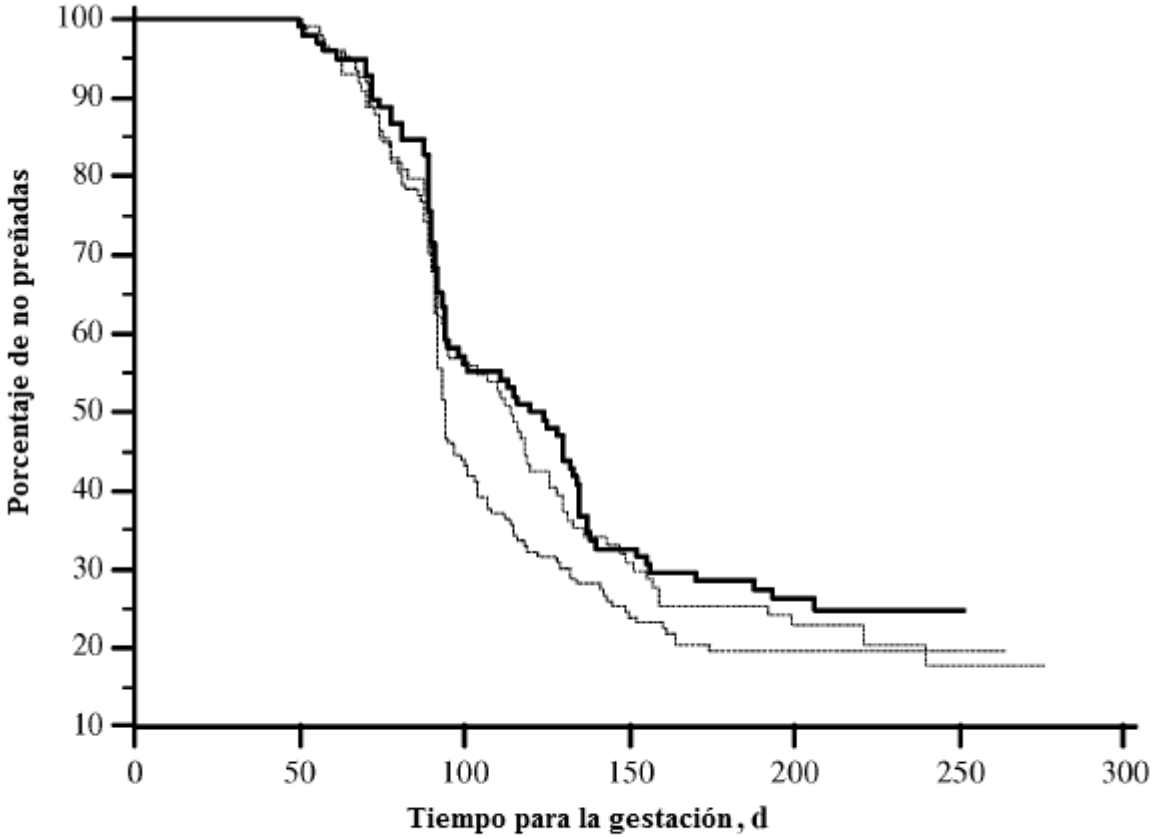

Porcentaje de no preñadas
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
50
100
150
200
250
300
Tiempo para la gestación, d

Figura 5