

ESTUDIO PRELIMINAR SOBRE LA CARACTERIZACIÓN DEL MICROBIOMA DE LA GÁNDULA MAMARIA EN OVEJAS ASSAF EN LACTACIÓN

Esteban-Blanco¹, C., Gutiérrez-Gil¹, B., Marina-García¹, H., Linaje², B., Acedo³ A. y Arranz¹, J.J.

¹Dpto. de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, 24071; León

²Consortio de Promoción del Ovino, Ctra. Zamora-Palencia, km. 49, 49630 Villalpando, Zamora; ³Biome Makers, Paseo de Belén, 9, 47011 Valladolid

INTRODUCCIÓN

La leche es un fluido biológico complejo producido por las hembras de los mamíferos, específico de la especie y adaptado para satisfacer las necesidades nutricionales del recién nacido. Clásicamente ha sido considerado un producto estéril hasta el momento de su secreción y se creía que las bacterias presentes en leche provenían de la piel de la madre o la cavidad oral del neonato (A. et al., 2018). Actualmente se sabe que la leche materna contiene varios nutrientes que ayudan a crear el microambiente adecuado para el desarrollo y la maduración intestinal (Ofstedal, 2002) y educa al sistema inmune confiriendo cierto grado de protección contra patógenos (Morrow and Rangel, 2004). Recientemente, varios estudios han revelado que el calostro y la leche materna son fuentes continuas de bacterias comensales, mutualistas y potencialmente probióticas para el lactante (Martin et al., 2003). El hecho de que los mismos géneros de bacterias puedan aislarse de la leche materna de hembras diferentes sugiere que su presencia en este sustrato es un evento común, aunque también existen diferencias importantes de unos animales a otros (Hunt et al., 2011). Habitualmente la identificación de microorganismos se ha realizado mediante aislamiento y análisis de pruebas morfológicas. Estos estudios se consideran ilimitados ya que muchas bacterias no se pueden cultivar y ofrecen poca información de la diversidad microbiana. Por esta razón, en los últimos años, el desarrollo de técnicas de secuenciación de ADN de alto rendimiento se está convirtiendo en una de las herramientas más utilizadas para estudiar el impacto de la comunidad de microorganismos, la llamada microbiota, en la salud humana y animal (Stubbendieck et al., 2016). Concretamente las técnicas basadas en la secuenciación del gen que codifica para la fracción 16S del RNA ribosómico permite una evaluación bastante completa de la biodiversidad de la muestra analizada. La microbiota de la leche materna está formada por una comunidad dinámica en la que existe un equilibrio complejo entre mutualista, comensales y organismos patógenos y cuya alteración puede influir en la calidad de los productos animales e incluso en el desarrollo de una enfermedad. En el caso concreto de las infecciones de la glándula mamaria, o mastitis en el ganado lechero, la relevancia de diferentes patógenos se conoce desde hace mucho tiempo pero el impacto de la compleja comunidad de microorganismos y su interacción en el desarrollo de la infección ha sido descrita sólo recientemente (Addis et al., 2016). Debido a los pocos estudios sobre la microbiota de la glándula mamaria en el ganado doméstico, el presente trabajo presenta un estudio preliminar de la biodiversidad bacteriana de la microbiota de la glándula mamaria de la oveja en lactación, en base a datos de secuenciación del gen 16S, y examinamos las diferencias entre la microbiota de grupos de ovejas con distintos valores de recuento de células somáticas (SCC), carácter indicador del estado de salud de la ubre.

MATERIAL Y MÉTODOS

Recogida de muestras: Para el presente estudio se obtuvieron dos muestras de leche, de 50 ml cada una, de un total de 49 ovejas lecheras de raza Assaf, de una granja de la provincia de Zamora perteneciente al Consorcio para la Promoción del Ovino (CPO). Ninguno de los animales muestreados presentaba signos clínicos de mastitis. Las muestras fueron obtenidas antes del ordeño de la mañana siguiendo la recomendación estándar del Consejo Nacional de Mastitis (Hogan, 1999); es decir, tras desinfectar las puntas de los pezones con alcohol etílico al 70%, descartando el primer chorro. Una de las muestras recogidas de cada animal se utilizó para obtener el recuento de células somáticas (SCC) y la otra para extracción del DNA. El SCC se utilizó para diferenciar las ovejas sanas de las que podrían presentar mastitis subclínica, siguiendo el umbral de 400.000 células/ml sugerido para las razas Assaf y Castellana por Gonzalez-Rodriguez et al. (1995).

Extracción de ADN, amplificación de 16S rRNA y secuenciación de alto rendimiento: Después de eliminar la grasa de la leche, las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 15000g

y el *pellet* obtenido se resuspendió en 0,5 ml de PBS a 4°C. El ADN se purificó mediante el uso de *Dneasy Powerlyzer powersoil kit* (Qiagen). La amplificación de la región 16S V4 del genoma bacteriano se realizó utilizando primers de BiomeMakers® (Patente WO2017096385). La secuenciación 2 x 301bp paired-end utilizando el *Illumina MiSeq* (Illumina, San Diego, CA, USA) generó un promedio de 150.000 lecturas por muestra.

Análisis bioinformático y estadístico: Los datos de secuenciación fueron ensamblados usando FLASH (Magoč and Salzberg, 2011), combinando pares de lectura en la orientación "outie" con un solapamiento mínimo de 300pb. Se llevó a cabo un filtrado y recorte de los datos con prinseq-lite (Schmieder and Edwards, 2011). En base a la valoración de la calidad de las muestras realizada con FastQC (Andrews, 2010) se recortaron las 8 primeras bases de cada secuencia. El formato fastq a formato fasta, necesario para los pasos de eliminación de ruido y detección de quimeras realizado con el software USEARCH (Edgar, 2016) y utilizando la base de datos de *Greengenes* como referencia (DeSantis et al., 2006). El pipeline *Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME)* 1.9.1 (Caporaso et al., 2010) se utilizó para obtener unidades taxonómicas operacionales (OTUs), mediante una búsqueda *de novo* con un umbral de similitud del 97%, y utilizando un programa de agrupamiento bayesiano que delinea OTUs basándose en la distribución natural de los datos. Las secuencias representativas fueron alineadas a través del método PyNAST e insertadas en el árbol filogenético para la anotación taxonómica. La taxonomía fue asignada contra la versión 13.8 de *Greengenes*. Las diversidades alfa y beta entre muestras se estimaron con el paquete Vegan R (Oksanen et al., 2018). Finalmente, se utilizó el paquete ampvis2 (Andersen et al., 2018) para realizar un análisis multivariante considerando los grupos de muestras establecidos en función del fenotipo SCC.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Según los recuentos de células somáticas, y siguiendo los criterios de Gonzalez-Rodriguez et al., (1995), entre las 49 muestras incluidas en el estudio se identificaron 36 muestras de ubres sanas ("Sanas") y 13 muestras compatibles con mastitis subclínica ("MS"), que a su vez, se dividieron en dos grupos, tipo1 ("MS1") (SCC > 4.000.000 células/ml) y tipo 2 ("MS2") (400.000 células/ml < SCC < 2.000.000 células/ml). Considerando todas las muestras, la secuenciación de la región V4 del gen 16S de ARN ribosómico generó un total de 7,93 millones de lecturas brutas de 301 pb. Después del ensamblado y el filtrado de calidad se utilizaron un total de 6.387.130 secuencias de 289 pares de bases. Tras aplicar la profundidad de secuencia a 10.027, de acuerdo con los recuentos observados más bajos, se hallaron en total 44.068 OTUs. Todos los OTUs se agruparon en 43 géneros, 3 del dominio *Archea* y 40 del dominio *Bacteria*, siendo los más abundantes *Firmicutes* (60,51%), *Actinobacterias* (17,18%) y *Proteobacterias* (9,46%). A nivel de género se obtuvieron 473 observaciones. Con el fin de simplificar estos resultados se estableció una clasificación adicional en la que, por un lado, se definió el conjunto "Otros", que agrupa aquellos géneros que aparecen en una proporción menor del 0,5%, y por otro lado se estableció el conjunto "Indefinidos", que agrupa aquellos OTUs en los que el método no ha sido capaz de asignar un género concreto y solo ha definido hasta el nivel de familia. Así, el 30,25% del total de las secuencias se agrupó bajo el conjunto "Indefinidos" y el 10,22% bajo el conjunto "Otros", obteniéndose 15 géneros abundantes entre los que destacan *Staphylococcus* (14,8%), *Corynebacterium* (11,8%), *Lactobacillus* (11,2%), *Alloiococcus* (4,6%) y *Streptococcus* (4%). Todas las muestras de leche analizadas revelaron una diversidad microbiana alta, independientemente de su recuento de SCC, apreciándose en las muestras del grupo MS1 un claro aumento del género *Staphylococcus* y *Streptococcus*, así como una reducción de la abundancia de géneros Indefinidos y Otros. La identificación del género *Staphylococcus* entre los más prevalentes del grupo MS1 concuerda con los resultados publicados en humano y bovino (Hunt et al., 2011; Kuehn et al., 2013). El análisis multivariante de coordenadas principales sobre la matriz de distancias mostró que las muestras sanas se discriminan fácilmente de las muestras del grupo MS1 (SCC > 4.000.000 células/ml) en función de sus perfiles de microbiota. Los análisis estadísticos no evidencian diferencias significativas grandes entre los tres grupos aquí considerados. Por ello, futuros estudios debieran basarse en un mayor número de muestras a analizar y, si es posible en abordar un análisis del metagenoma completo para poder detectar microorganismos (por ejemplo: hongos) que con el análisis del gen 16S no pueden ser identificado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• A. WP, H. HJ and M. MO 2018, *Journal of Applied Bacteriology* 46, 269–277 • Addis et al. 2016, *Molecular bioSystems* 12, 2359–2372 • Andersen et al. 2018, *bioRxiv* • Andrews 2010 • Caporaso et al. 2010, *Nature methods* 7, 335–336 • DeSantis et al. 2006, *Applied and environmental microbiology* 72, 5069–5072 • Edgar 2016, *bioRxiv* • Gonzalez-Rodriguez et al. 1995, *Journal of dairy science* 78, 2753–2759 • Heikkila et al. 2003, *Journal of applied microbiology* 95, 471–478 • Hogan 1999. *WI: National Mastitis Council* • Hunt et al. 2011, *PLOS ONE* 6, e21313 • Isaacs 2005, *The Journal of Nutrition* 135, 1286–1288 • Kuehn et al. 2013, *PLOS ONE* 8, e61959 • Magoč et al. 2011, *Bioinformatics* 27, 2957–2963 • Martin et al. 2003, *The Journal of pediatrics* 143, 754–758 • Morrow et al. 2004, *Seminars in pediatric infectious diseases* 15, 221–228 • Oftedal 2002, *Journal of mammary gland biology and neoplasia* • Oksanen et al. 2018, *Bioinformatics* 27, 863–864 • Stubbendieck et al. 2016, *Frontiers in microbiology* 7, 1234.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto AGL-2015-66035-R del MINECO. C. Esteban-Blanco es beneficiaria de una beca FPI asociada al anterior proyecto (BES-2016-07-8080). B. Gutiérrez-Gil es investigadora contratada a través del programa “Ramón y Cajal” del MINECO (RYC-2012-10230).

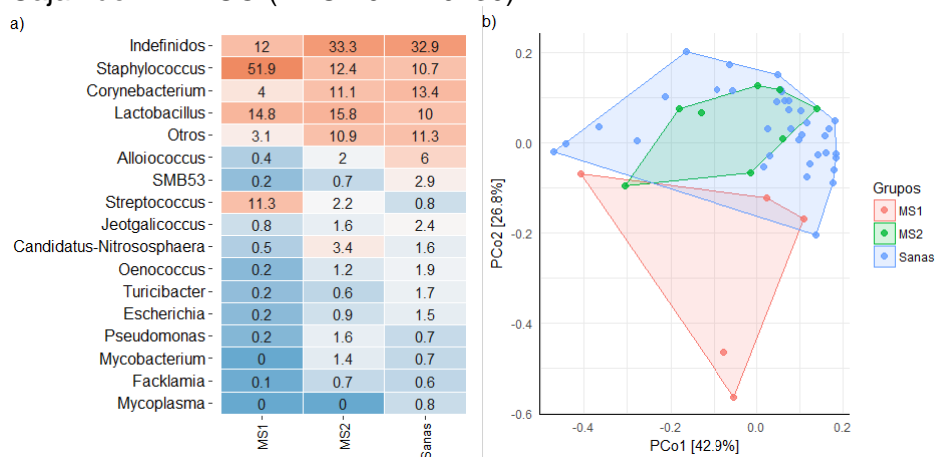


Figura 1. a) Comparación de la abundancia relativa de géneros dentro de los tres grupos clasificados en este estudio. **b)** Análisis de coordenadas principales considerando los tres grupos establecidos en función del SCC, basado en la matriz de distancias Bray-Curtis.

PRELIMINARY STUDY ON THE CHARACTERIZATION OF THE MAMMARY GLAND MICROBIOME IN LACTATING ASSAF SHEEP

ABSTRACT: The aim of this study was to use high-throughput sequencing of the 16S rRNA gene to describe the microbial diversity of ovine milk samples classified as derived from healthy and subclinical mastitis dairy ewes based on somatic cell counts (SCC). Milk samples from 49 Assaf sheep were analysed for SCC and used for extraction of bacterial DNA. Based on SCC, 36 samples were classified as “Healthy”, and 13 as “Subclinical Mastitis”, type 1 and type 2 (MS1, MS2). The region V4 of the 16S rRNA gene was individually amplified and sequenced for all the samples. *QIIME 1.9.1* software analysis was performed, and 44,068 operational taxonomic units (OTUs) were identified in total, distributed in 473 genera, although 436 genus show up in very little proportion (<0.1%) and were clustered under a group called “Others”. The milk of sheep was dominated by *Staphylococcus*, accounting for 14.8%, followed by *Corynebacterium* (11.8%), *Lactobacillus* (11.2%), *Alloiococcus* (4.6%), and *Streptococcus* (4%). The samples included in the MS1 group based on SCC showed a higher presence of *Staphylococcus* y *Streptococcus*, and a decrease of the proportion of genera included the “Undefined” and “Others” groups, although significant differences were not found between groups. Future studies based on a larger number of samples and metagenome sequencing analysis may help to decipher the importance of microbioma in the sheep udder health.

Keywords: high-throughput sequencing, 16S rRNA gene, diversity, microbiome, OTUs.