

Efecto de péptidos antibiopelícula en aislamientos microbiológicos obtenidos de leche cruda bovina

Effect of antibiofilm peptides on microbiological isolates obtained from raw cattle milk

Claudia Cruz Hernández¹, Andrea Tatiana Durán-Rodríguez²,
Jeannette Navarrete Ospina³, Luz Mary Salazar P.⁴,
Jaime Andrés Cubides-Cárdenas⁵, Liliana Constanza Muñoz Molina^{3*}

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de cuatro péptidos antibiopelícula (ACLL37-1, ACLL37-2, DLL37-1 y LL37-1) en aislamientos microbiológicos en leche cruda bovina. Se aplicó un estudio piloto descriptivo experimental con muestras de leche de 14 vacas en ordeño. En los aislamientos microbiológicos se determinó la biopelícula mediante cristal violeta, curvas de crecimiento y se evaluó el efecto antibiopelícula con los péptidos en estudio. De 56 muestras de leche se aislaron 41 microorganismos. El 69.2% correspondió a *Staphylococcus coagulans* negativos (SCN). Asimismo, 30 cepas se identificaron como fuertemente adherentes formadoras de biopelícula (73.2%) y 7 (17.1%) débilmente adherentes. En las curvas de crecimiento con los péptidos se observó un aumento de la fase lag tardía y respecto al efecto inhibitorio

¹ Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

² Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil

³ Grupo de investigación REMA, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Bogotá, Colombia

⁴ Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

⁵ Grupo de Investigación e Innovación en Salud y Bienestar Animal, Laboratorio de Salud Animal y Microbiología Pecuaria, Centro de Investigación Tibaitatá, Agrosavia, Colombia

* E-mail: lcmunoz@unicolmayor.edu.co

Recibido: 12 de diciembre de 2022

Aceptado para publicación: 28 de junio de 2023

Publicado: 31 de octubre de 2023

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

de los péptidos presentan un comportamiento heterogéneo frente a cada aislamiento; sin embargo, los péptidos con mayor porcentaje de inhibición fueron LL37-1, DLL37-1 y ACLL37-1. En conclusión, los péptidos en estudio pueden ser considerados como una alternativa promisoriosa en la inhibición de la formación de biopelícula de bacterias que pueden impactar la salud de la ubre de las vacas de lechería especializada.

Palabras clave: antimicrobianos, biopelícula, microorganismos, péptidos

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the effect of four antibiofilm peptides (ACLL37-1, ACLL37-2, DLL37-1 and LL37-1) on microbiological isolates in raw cattle milk. An experimental descriptive pilot study was applied with milk samples from 14 milking cows. The microbiological isolation was made, the biofilm was extinguished by crystal violet, growth curves and the antibiofilm effect was evaluated with the peptides under study. From 56 milk samples, 41 microorganisms were isolated and 69.2% corresponded to negative coagulase-negative *Staphylococcus* (SCN). Likewise, 30 strains were identified as strong biofilm-forming adherents (73.2%) and 7 (17.1%) weakly adherents. In the growth curves with the peptides, an increase in the late lag phase was demonstrated and regarding the inhibitory effect of the peptides, it was found that they present a heterogeneous behavior compared to each isolate; however, the peptides with the highest percentage of inhibition were LL37-1, DLL37-1 and ACLL37-1. It is concluded that the peptides under study can be considered as a promising alternative in the inhibition of bacterial biofilm formation that can impact the udder health of specialized dairy cows.

Key words: antimicrobials, biofilm, microorganisms, peptides

INTRODUCCIÓN

El acopio total de leche en Colombia en 2018 fue de 3.146 millones de litros, lo que sitúa al país como el cuarto productor en América Latina (Asoleche, 2019). La leche es un producto esencial en la alimentación humana debido a su alto contenido nutricional, pero requiere estar libre de microorganismos por su impacto en la salud pública. La pasteurización de la leche cruda inactiva estos agentes microbianos contaminantes (Machado *et al.*, 2017).

El aumento de la carga microbiana en la leche cruda está asociada a diversas variables geográficas y ambientales. La temperatura, humedad, calidad del aire y del agua, tipo de forraje, tamaño del hato, el sistema de

ordeño y las condiciones de almacenamiento pueden generar cambios en la morfología de la ubre y en la microbiota de la glándula mamaria del bovino (Ouamba *et al.*, 2022).

Los microorganismos asociados a la leche cruda que se encuentran con mayor frecuencia son: *Enterococcus* spp, *Staphylococcus* coagulasa negativa, *Aerococcus* spp, *Streptococcus* spp, *Acinetobacter* spp, *Bacillus* spp, *Enterobacter* spp, *Corynebacterium* spp, *Kocurias* spp, *Pseudomonas* spp, *Listeria* spp, *Salmonella* spp, *Escherichia coli* (Quigley *et al.*, 2013). El desarrollo de estas bacterias se convierte en un factor nocivo en la salud de la ubre, dada la capacidad de crear resistencia a diferentes agentes antimicrobianos o formar biopelículas. Esta última se define como una comunidad bacteriana englobada en una matriz de exopoli-

sacáridos con capacidad de adherirse a una superficie viva o inerte (Carniello *et al.*, 2018).

Nuevas moléculas naturales con propiedades terapéuticas, conocidas como péptidos antimicrobianos (AMPs), pueden favorecer la erradicación de la formación de biopelícula, como lo son los péptidos derivados de la catelecidina humana LL-37 y sus análogos con modificaciones estructurales en el grupo amino terminal denominado (ACLL-37), y un enantiómero (DLL-37), con dos fenilalaninas en los extremos de la secuencia del péptido (Kusaka *et al.*, 2018; Torres *et al.*, 2019). Los D-péptidos son resistentes a la degradación proteolítica debido a una barrera energética libre extremadamente alta, dada por una incompatibilidad estérica y por un estado de transición del complejo enzima-sustrato, siendo menos inmunogénicos. La modificación de N-terminales y C-terminales mediante la acetilación intensifican la estabilidad de la acción proteolítica (Lander *et al.*, 2022).

Ante esto, se planteó determinar los microorganismos presentes en leche cruda bovina y su capacidad de formación de biopelícula con el propósito de evaluar cuatro péptidos derivados de la catelecidina humana LL-37, como una posible alternativa profiláctica y terapéutica y de esta forma contribuir en la disminución de infecciones bovinas en el área rural de Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y Tamaño Muestral

El estudio se realizó en dos hatos del trópico alto colombiano (municipio de Caldas, Boyacá) con una población total de 55 vacas adultas. El tamaño mínimo muestral fue determinado mediante el muestreo basado en la detección de enfermedad (Schmoor *et al.*, 2000), con una prevalencia esperada mínima del 18% y con un nivel de confianza del 95%,

suponiendo encontrar al menos una vaca con mastitis. Se determinó una muestra de 14 vacas para las dos fincas, y tomando en cuenta la fracción de muestreo del 25.45% previo con relación a la proporción de vacas por raza en las dos fincas se llegó a seleccionar 6 vacas Holstein Friesian, 6 Jersey y 2 Normando.

Se consideraron vacas con al menos un parto, que estuvieran en el segundo tercio de lactancia, y con la misma alimentación del hato (pastoreo en *Cenchrus clandestinus* y concentrado comercial con 18% de proteína) y clínicamente sanas. Se excluyeron vacas con tratamientos con antibióticos o con historia de mastitis al inicio de la lactancia.

Toma de Muestras

Se hizo un chequeo de mastitis subclínica mediante la prueba de California Mastitis Test (Gómez-Quispe *et al.*, 2015), y se procedió con la toma de la muestra de cada cuarto mamario (total 56 muestras) previa limpieza y desinfección del pezón. Las muestras fueron colectadas en tubos Falcon estériles de 50 mL y se llevaron a 4 °C en neveras portátiles hasta el laboratorio de microbiología de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca en menos de 10 horas para el análisis microbiológico. Asimismo, se entrevistó a los productores sobre la edad, producción de leche, raza, nutrición, número de partos, abortos, tipo de alimentación, infecciones presentadas y tratamientos antimicrobianos.

Caracterización Microbiológica

Se realizó la búsqueda y caracterización de microorganismos en las muestras colectadas. Se sembró 20 µl de leche cruda en los medios de cultivo MacConkey, BHI (Infusión Cerebro Corazón), bilis esculina y CHROMagar™ para *Staphylococcus*, que fueron incubados por 24 h a 37 °C. La identificación microbiana se hizo por el método VITEK®2 de Biomeriux.

Determinación de la Formación de Biopelícula

La adherencia de los aislamientos en las cepas estudiadas y controles por triplicado fue evaluada según la técnica descrita por Christensen *et al.* (1985). Para esto, en microplacas de 96 pozos se inocularon 195 μ L de caldo LB con glucosa al 1% y 5 μ L de suspensión bacteriana a escala de Mac Farland 0.5. Las placas fueron incubadas por 24 h a 37 °C. Posteriormente, el contenido de cada pozo fue descartado y el sedimento adherido a la placa se fijó con paraformaldehído 4% durante 10 min. Después de retirarlo se adicionó 200 μ L de cristal violeta al 0.4% en cada pozo por 10 min; luego se descartó el exceso de colorante y las placas fueron secadas a temperatura ambiente por 10-15 min. Finalmente, el colorante adherido se solubilizó con 200 μ L de ácido acético al 30% y las placas fueron leídas a una densidad óptica de 450 nm y 620 nm en un lector de MicroElisa (Multiskan EX, Thermo Scientific). Se realizó clasificación de los aislamientos según la densidad óptica obtenida: no adherentes (0.120), débilmente adherentes (>0.120 - \leq 0.240) y fuertemente adherentes (>0.240).

Determinación de Factores de Adhesión

Se observó la presencia de los factores de adhesión *clfA*, *clfB*, *fnbA*, *fbe*, *SdrC* y *SdrE* en seis aislamientos de *Staphylococcus coagulasa* negativa y un aislamiento de *S. aureus* que mostraron ser fuertemente adherentes por el método de cristal violeta. Se extrajo el ADN bacteriano con el Wizard Genomic DNA purification kit (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante. Para la amplificación se realizó PCR múltiple, con las siguientes condiciones: 25 ciclos de amplificación con una desnaturalización inicial de 94 °C, desnaturalización por 1 min, hibridación a 55 °C por 1 min, extensión a 72 °C por 1 min y una extensión final de 72 °C por 10 min. Se utilizó una mezcla con un volumen final de 25 μ L y concentración final: buffer 1X, MgCl₂ de 3 μ M, dNTPs 100Mm, cebadores F y R de 0.5 μ M y la Taq polimerasa a 0.05 U/ μ L. Como controles positivos se usaron las cepas USA 300, ATCC 35984 y como control negativo la cepa ATCC 12228. La secuencia de los cebadores utilizados se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Cebadores utilizados para la determinación de factores de adhesión en los aislamientos microbianos de muestras de leche bovina cruda

Factor de adhesión	Secuencia	Tamaño del amplicón
<i>clfA-F</i>	TGCTGCACCTAAAACAGACG	210 pb
<i>clfA-R</i>	CAGTTACCGGCGTTTCTTCC	
<i>clfB-F</i>	AGCATTTACTACCGGTTTCAGCA	96 pb
<i>clfB-R</i>	CCACAAACGATTTCCAATGCGC	
<i>SdrC-F</i>	CCGTTTCTACTGGCAATGCT	148 pb
<i>SdrC-R</i>	GTTACATTGCCAACGCCTTT	
<i>FnbA-F</i>	TACCGCTATTTTGCCACCT	180 pb
<i>FnbA-R</i>	AGCATGGTCAAGCACAAGGA	
<i>fbe -F</i>	TCGCCATCAACTAACGCTCAA	188 pb
<i>fbe-R</i>	CCCTGTTTCAGCAAGTTCGTC	
<i>SdrE -F</i>	GGACGATTACACGACGATACAGC	137 pb
<i>SdrE- R</i>	GCAAGTCACCTTGTCCTTGACCT	

Cuadro 2. Caracterización microbiana y formación de biopelícula en aislamientos de bacterias de muestras de leche cruda

Aislamiento ^a	Microorganismo	Identidad ^b (%)	Formación de biopelícula	
			Biofilm: DO (620-450 nm)	Capacidad de formación de biopelícula
1.1B	<i>Staphylococcus sciuri</i>	97	0.45 ± 0.41	FA
1.2C	<i>Kocuria kristinae</i>	90	0.54 ± 0.56	FA
1.3B	<i>Staphylococcus aureus</i>	91	0.71 ± 0.98	FA
1.4C	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	90	0.52 ± 0.58	FA
1.4D	<i>Staphylococcus lentus</i>	93	0.23 ± 0.31	FA
1.4E	<i>Staphylococcus lentus</i>	93	0.21 ± 0.29	FA
2.3C	<i>Streptococcus agalactiae</i>	94	0.19 ± 0.23	DA
2.4 ^a	<i>Enterococcus faecium</i>	98	0.12 ± 0.22	DA
3.1 ^a	<i>Aerococcus viridans</i>	90	0.51 ± 0.61	FA
3.1B	<i>Enterococcus faecium</i>	98	0.23 ± 0.29	FA
3.3C	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	90	0.71 ± 0.75	FA
4.3C	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	90	0.70 ± 0.79	FA
4.4B	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	90	0.51 ± 0.58	FA
5.1B	<i>Staphylococcus warneri</i>	92	0.75 ± 0.78	FA
5.1C	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	90	0.33 ± 0.39	FA
5.2 ^a	<i>Staphylococcus hominis spp</i>	93	1.69 ± 1.74	FA
5.2B	<i>Staphylococcus xylosis</i>	94	0.30 ± 0.36	FA
5.4 ^a	<i>Staphylococcus caprae</i>	94	0.023 ± 0.024	NA
5.4B	<i>Staphylococcus warneri</i>	95	1.62 ± 1.68	FA
8.2 ^a	<i>Kocuria rhizophila</i>	97	0.60 ± 0.70	FA
8.2B	<i>Staphylococcus warneri</i>	95	0.044 ± 0.049	NA
8.3B	<i>Aerococcus viridans</i>	98	0.30 ± 0.35	FA
9.2B	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	90	0.51 ± 0.54	FA
9.3H	<i>Staphylococcus simulans</i>	90	0.62 ± 0.72	FA
10.1B	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99	0.54 ± 0.57	FA
10.2 ^a	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	93	0.33 ± 0.38	FA
10.3 ^a	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	95	0.70 ± 0.74	FA
10.4C	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	90	0.69 ± 0.75	FA
11.3B	<i>Enterococcus faecium</i>	94	0.52 ± 0.58	FA
11.4B	<i>Staphylococcus warneri</i>	92	0.48 ± 0.53	FA
12.1C	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	90	0.50 ± 0.62	FA
12.2 ^a	<i>Staphylococcus hominis spp</i>	90	0.40 ± 0.48	FA
12.2B	<i>Staphylococcus warneri</i>	92	0.44 ± 0.47	FA
12.3C	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	90	0.42 ± 0.45	FA
12.4B	<i>Staphylococcus warneri</i>	92	0.18 ± 0.20	DA
13.4B	<i>Staphylococcus simulans</i>	94	0.19 ± 0.20	DA
14.3B	<i>Aerococcus viridans</i>	99.9	0.22 ± 0.24	DA
6.4G	<i>Serratia liquefaciens</i>	99.9	0.10 ± 0.16	DA
8.3G	<i>Serratia liquefaciens</i>	99.9	0.10 ± 0.21	DA
10.4G	<i>Serratia liquefaciens</i>	99.9	0.085 ± 0.088	NA
13.3G	<i>Serratia liquefaciens</i>	99.9	0.074 ± 0.078	NA

^a Identificación del aislamiento; ^b. porcentaje de identidad dado por el sistema VITEK2 de Biomeriux; DO: densidad óptica

NA: no adherente; DA: débilmente adherente; FA: fuertemente adherente

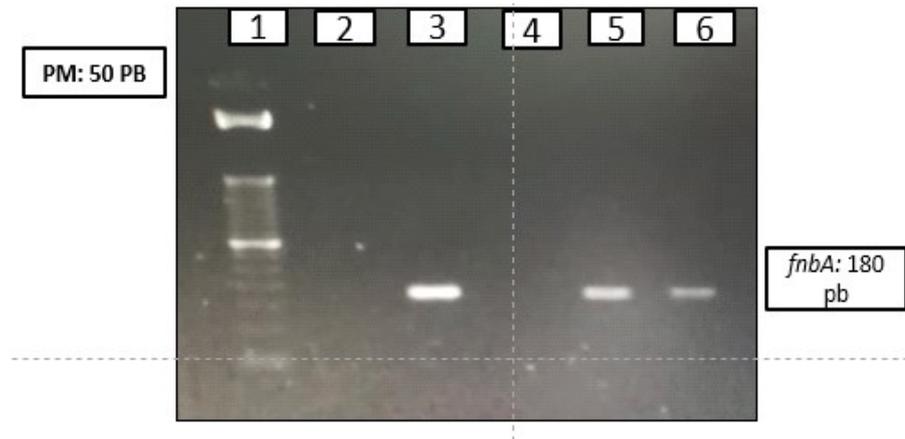


Figura 1. Detección molecular del factor de adhesión *fnbA* (180pb) mediante PCR múltiple. 1. Marcador de peso molecular (50 pb). 2. control negativo *S. epidermidis* ATCC 12228. 3. control positivo *S. aureus* USA 300. 5 Control positivo *S. epidermidis* ATCC 35984. 6. Aislamiento microbiano 1.3B

Efecto de los Péptidos en la Cinética de Crecimiento Bacteriano

Los aislamientos bacterianos y las cepas control formadoras de biopelícula *Staphylococcus aureus* USA 300, *S. epidermidis* ATCC 35984 y no formadora *S. epidermidis* ATCC 12228 fueron inoculadas por triplicado, adicionando 30 μ L de microorganismo a escala de Mac Farland 0.5 en 270 μ L de caldo LB por pozo, sin tratamiento con péptido y con péptido ACLL37-1, ACLL37-2, DLL37-1 o LL37-1 a una concentración final de 5 μ M en placas de 96 pozos en agitación continua a 37 °C. Las lecturas de absorbancia se hicieron a una densidad óptica de 600 nm en el equipo Bioscreen C.

Efecto Inhibitorio de los Péptidos en la Formación de Biopelícula

Fueron elegidos tres aislamientos fuertemente adherentes y se evaluó el efecto inhibitorio de los péptidos ACLL37-1, ACLL37-2, DLL37-1 y LL37-1 a una concentración final de 5 μ M en el proceso de formación de biopelícula, siguiendo el protocolo anterior-

mente mencionado realizando lecturas a las 24 h de incubación (Christensen *et al.*, 1985).

Análisis Estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados en el programa GraphPrism 8. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Inicialmente se realizó el test de normalidad y el test de comparaciones múltiples Two-way ANOVA con post test de Tukey para las curvas de crecimiento y porcentajes de inhibición de biopelícula por péptido.

RESULTADOS

La rutina de ordeño fue similar en ambos sistemas productivos. El ordeño es manual haciendo el lavado, despunte, preselle y selle de manera adecuada. El resultado de la prueba de CMT fue negativa (0) para 53/54 cuartos y presencia de trazas en solo un cuarto (1/54). Ninguno de los animales presentó signos de mastitis clínica. Los productores reportaron solo una vaca Holstein Friesian había presentado un aborto espontáneo y una

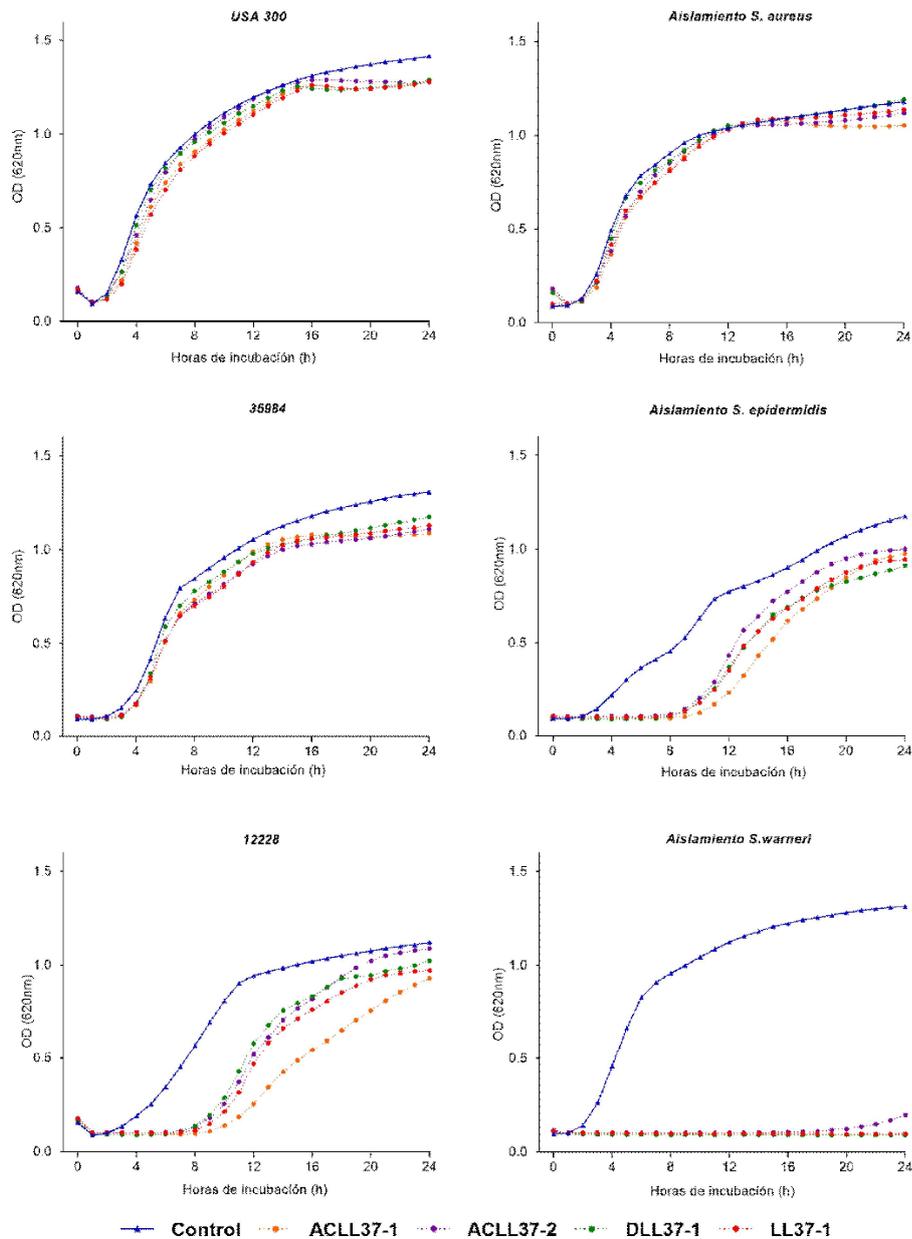


Figura 2. Efecto de los péptidos sintéticos a una concentración de 5 μ M en las curvas de crecimiento bacteriano de aislamientos bacterianos de leche cruda y controles en 24 horas de incubación. Los datos mostrados corresponden a la media de la densidad óptica de ensayos realizados por triplicado de mediciones realizadas cada hora durante 24 h

Jersey presentó una lesión pequeña en el cuarto mamario anterior derecho; sin embargo, ninguna vaca presentó signos de mastitis clínica o subclínica.

Se obtuvieron 41 aislamientos de las 56 muestras de leche analizadas. De estas, 27 cepas

(65.9%) correspondieron a *Staphylococcus* coagulasa negativo (SCN), siendo *S. epidermidis* el microorganismo predominante con 12 aislamientos (29.3%); 1 aislamiento (2.4%) correspondió a *S. aureus* y otro (2.4%) a *S. agalactiae*. Además, 8 (19.5%) aislamientos pertenecieron a otros cocos Gram

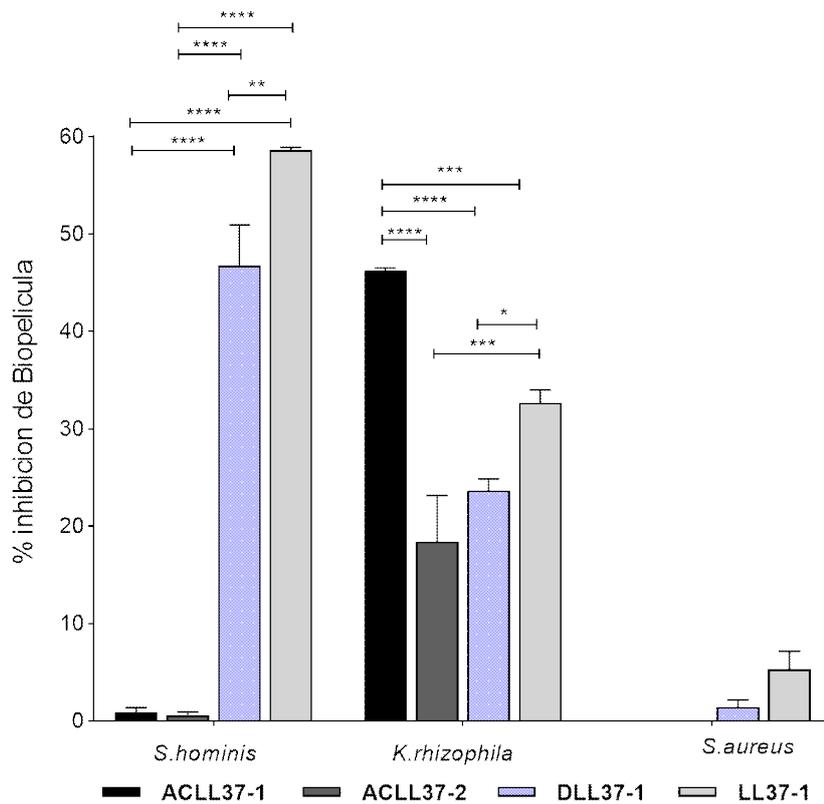


Figura 3. Inhibición de biopelícula en 24 horas de los péptidos análogos a una concentración de 5 μ M en aislamientos de *S. hominis*, *K. rhizophila* y *S. aureus*. Los datos mostrados corresponden a la media de los porcentajes de inhibición de los aislamientos clínicos por especie realizados por triplicado. Test Two-way Anova, post test Tukey's. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

positivos y 4 (9.8%) a cepas de *S. liquefaciens* (Cuadro 2). (19.5%) aislamientos pertenecieron a otros cocos Gram positivos y 4 (9.8%) a cepas de *Serratias liquefaciens* (Cuadro 2).

De los 41 aislamientos bacterianos, 30 (73.2%) fueron clasificados por el método de Cristal Violeta como fuertemente adherentes, 7 (17.1%) como débilmente adherentes y 4 (9.8%) como no adherentes (Cuadro 2).

De los 8 asilamientos de *Staphylococcus* spp analizados, se encontró en el aislamiento 1.3B correspondiente a *S. aureus* el factor de adhesión *FnbA* (Figura 1).

Los péptidos antimicrobianos mostraron prolongación de la fase de latencia (lac), principalmente en el aislamiento de *S. epider-midis* y la cepa 12228. De forma interesante, el aislamiento de *S. warneri* sometido a tratamiento mostró inhibición total del crecimiento.

En la Figura 3 se observa que los péptidos evaluados poseen un considerable porcentaje de inhibición de biopelícula en tres aislamientos caracterizados como fuertemente adherentes. El efecto biológico fue más evidente en el *Staphylococcus* coagulasa negativo *S. hominis* y en el aislamiento de tipo ambiental *Kocuria rhizophila*. En con-

traste, en el aislamiento perteneciente a *S. aureus* no hubo inhibición de biopelícula en formación cuando fue tratado con esta concentración de péptido y en el tiempo de incubación evaluado.

Frente a *S. hominis* los péptidos LL37-1 y DLL37-1 mostraron buenos porcentajes de inhibición; sin embargo, se encontró diferencia estadística entre estos dos tratamientos, siendo el péptido LL37-1 quien mostró un mejor resultado. En *K. rhizophila* el péptido ACLL37-1 presentó diferencia estadística en relación a los otros péptidos, siendo el mejor candidato para este tipo de microorganismo.

DISCUSIÓN

Uno de los principales factores que afectan la calidad de la leche cruda es la diversidad o composición de la microbiota bacteriana. Se reportan bacterias de los géneros *Aerococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Kocuria*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas* y *Corynebacterium* (Quigley *et al.*, 2013). En este estudio se encontraron bacterias de los cinco primeros géneros mencionados, además de *Serratia liquefaciens*. Sobre este último se ha demostrado su capacidad para producir proteasas estables al calor resistiendo los procesos de pasteurización (Machado *et al.*, 2015); sin embargo, la gran mayoría de microorganismos correspondieron a *Staphylococcus coagulasa negativo* (SCN) con 27 cepas (65.9%). Todos estos microorganismos, bajo condiciones específicas, pueden favorecer la inflamación del tejido mamario del animal sin signos clínicos, lo que se conoce como mastitis subclínica (De Visscher *et al.*, 2015; Isaac *et al.*, 2017; Khazandi *et al.*, 2018), ocasionando reducción en la producción de la leche y pérdidas económicas en la industria lechera. Asimismo, los casos subclínicos se convierten en reservorios que favorecen la transmisión de la infección a otros animales (Valero-Leal *et al.*, 2017).

Se reporta la capacidad de diversos microorganismos aislados en leche cruda de organizarse en consorcios bacterianos y formar biopelícula gracias a la expresión genética de ciertos factores de virulencia (Valero-Leal *et al.*, 2017; Naushad *et al.*, 2019). En el presente estudio se confirmó que 73.2% de los aislamientos son formadores de biopelícula y que los péptidos LL37-1, DLL37-1 y el ACLL37-1 (péptidos análogos derivados de la catelecidina humana LL-37) fueron los de mayor porcentaje de inhibición ($p < 0.0001$). Estos péptidos podrían estar actuando sobre los componentes de la biopelícula al inhibir la adhesión y colonización gracias a que a su naturaleza catiónica suelen mostrar un equilibrio entre los residuos de aminoácidos hidrófobos y al estar cargados positivamente adoptan una conformación anfipática que les permite una mayor interacción con las membranas bacterianas con carga negativa, inhibir el plegamiento de proteínas, la actividad enzimática, o actuar intracelularmente (Hell *et al.*, 2010; Bechinger y Gorr, 2017). Los resultados obtenidos concuerdan con el estudio de Shahid *et al.* (2020) al inhibir el crecimiento *in vitro* de *Prototheca bovis* con el empleo de la catelecidina humana LL-37.

La gran mayoría de los aislamientos obtenidos correspondieron a microorganismos de tipo ambiental que generalmente se encuentran presentes en el bovino; no obstante, se destaca la presencia de *Staphylococcus aureus*, formador de biopelícula, que puede llegar a expresar genes de resistencia a β -lactámicos y macrólidos (Sharun *et al.*, 2021). Adicionalmente tiene la capacidad de colonizar el canal del pezón y penetrar hasta los tejidos secretores del animal aumentando las infecciones y la ocurrencia de mastitis clínica (Marques *et al.*, 2017; Algharib *et al.*, 2020). *S. aureus* se propaga principalmente por contacto, por lo que la bioseguridad del rebaño puede considerarse como una medida preventiva para la reducción y eliminación de los reservorios (Keefe, 2012; Sharun *et al.*, 2021).

Los péptidos antimicrobianos ensayados no inhibieron la biopelícula correspondiente a *S. aureus*, al que adicionalmente se le identificó molecularmente el factor de adhesión *FnbA*. Este microorganismo se une a componentes de la matriz extracelular e invade las células epiteliales de la glándula mamaria bovina por medio de las proteínas de unión a la fibronectina (FnBP), codificadas por los genes *FnbA* y *FnbB*, que permiten la interacción entre las células bacterianas con los receptores de fibronectina de células de mamíferos específicamente a través de las integrinas $\alpha 5\beta 1$ (Pereyra *et al.*, 2016). La presencia de alguna de estas adhesinas favorece la acumulación y proliferación bacteriana, constituyéndose como factores de virulencia (Pinilla *et al.*, 2017).

La terapia antibiótica sigue siendo la principal herramienta para infecciones bovinas como la mastitis; sin embargo, los microorganismos que forman biopelícula han demostrado resistencia parcial o completa a diferentes antimicrobianos (Sánchez Bonilla *et al.*, 2018), por lo que el estudio de las catelecidinas cada vez cobra más importancia en el campo veterinario, ya que están presentes en las células epiteliales mamarías de bovinos que presentan inflamación intramamaria, pero no en animales sanos, por lo que podrían llegar a ser un marcador de mastitis sensible y específico (Cubeddu *et al.*, 2017). Adicionalmente las catelecidinas bovinas BMAP-27 y BMAP-28 han mostrado resultados satisfactorios frente aislamientos de *S. aureus* y *E. coli*, obtenidos de bovinos con mastitis subclínica (Langer *et al.*, 2017).

La utilidad de este tipo de estudios piloto es que permite conocer la composición microbiana presente en leche cruda, la capacidad de estos microorganismos de formar biopelícula y el efecto de los péptidos antimicrobianos sobre los mismos. Sin embargo, a futuro se debe realizar un mayor muestreo, con el fin de evaluar el efecto de los péptidos frente a bacterias Gram negativas, así como ensayos de citotoxicidad.

CONCLUSIÓN

Se demuestra la importancia del estudio de péptidos antimicrobianos derivados de la catelecidina humana en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para la intervención de las infecciones y enfermedades inflamatorias en bovinos, gracias a sus características biológicas y propiedades inmunomoduladoras.

Agradecimientos

El proyecto fue ejecutado en la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca y financiado por la convocatoria N.º 775 de 2017: Jóvenes investigadores e innovadores por la paz del Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (COLCIENCIAS). Un especial agradecimiento a la comunidad del municipio de Caldas, Boyacá, Colombia, por su aceptación y colaboración para la ejecución del proyecto de investigación. Un agradecimiento al docente William Alberto Méndez Hurtado por su acompañamiento y asesoría en las jornadas de toma de muestras.

LITERATURA CITADA

1. **Algharib SA, Dawood A, Xie S. 2020.** Nanoparticles for treatment of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. Drug Deliv 27: 292-308. doi: 10.1080/10717544.2020.1724209
2. **[Asoleche] Asociación Colombiana de Procesadores de la Leche. 2019.** Leche en cifras. [Internet]. Disponible en: <https://asoleche.org/leche-en-cifras/>
3. **Bechinger B, Gorr SU. 2017.** Antimicrobial peptides: mechanisms of action and resistance. J Dent Res 96: 254-260. doi: 10.1177/0022034516679973
4. **Carniello V, Peterson BW, van der Mei HC, Busscher HJ. 2018.** Physicochemistry from initial bacterial adhesion to surface-programmed biofilm growth.

- Adv Colloid Interfac 261: 1-14. doi: 10.1016/j.cis.2018.10.005
5. **Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH. 1985.** Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. J Clin Microbiol 22: 996-1006. doi: 10.1128/jcm.22.6.996-1006.1985
 6. **Cubeddu T, Cacciotto C, Pisanu S, Tedde V, Alberti A, Pittau M, Dore S, et al. 2017.** Cathelicidin production and release by mammary epithelial cells during infectious mastitis. Vet Immunol Immunop 189: 66-70. doi: 10.1016/j.vetimm.2017.06.002
 7. **De Visscher A, Piepers S, Supré K, Haesebrouck F, De Vliegher S. 2015.** Short communication: Species group-specific predictors at the cow and quarter level for intramammary infection with coagulase-negative staphylococci in dairy cattle throughout lactation. J Dairy Sci 98: 5448-5453. doi: 10.3168/jds.2014-9088
 8. **Gómez-Quispe OE, Santivañez-Ballón CS, Arauco-Villar F, Espezu-Flores OH, Manrique-Meza J. 2015.** Criterios de interpretación para California Mastitis Test en el diagnóstico de mastitis subclínica en bovinos. Rev Inv Vet Perú 26: 86-95. doi: 0.15381/rivep.-v26i1.10912
 9. **Hell E, Giske CG, Nelson A, Römling U, Marchini G. 2010.** Human cathelicidin peptide LL37 inhibits both attachment capability and biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. Lett Appl Microbiol 50: 211-215. doi: 10.1111/j.1472-765X.2009.02778.x
 10. **Isaac P, Bohl LP, Breser ML, Orellano MS, Conesa A, Ferrero MA, Porporatto C. 2017.** Commensal coagulase-negative *Staphylococcus* from the udder of healthy cows inhibits biofilm formation of mastitis-related pathogens. Vet Microbiol 207: 259-266. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.05.025
 11. **Keefe G. 2012.** Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. Vet Clin N Am-Food A 28: 203-216. doi: 10.1016/j.cvfa.2012.03.010
 12. **Khazandi M, Al-Farha AA, Coombs GW, O'Dea M, Pang S, Trott DJ, Aviles RR, et al. 2018.** Genomic characterization of coagulase-negative staphylococci including methicillin-resistant *Staphylococcus sciuri* causing bovine mastitis. Vet Microbiol 219:17-22. doi: 10.1016/j.vetmic.2018.04.004
 13. **Kusaka S, Nishida A, Takahashi K, Bamba S, Yasui H, Kawahara M, Inatomi O, et al. 2018.** Expression of human cathelicidin peptide LL-37 in inflammatory bowel disease. Clin Exp Immunol 191: 96-106. doi: 10.1111/cei.13047
 14. **Lander AJ, Jin Y, Luk LYP. 2023.** D-peptide and d-protein technology: recent advances, challenges, and opportunities. Chembiochem 24: e202200537. doi: 10.1002/cbic.202200537
 15. **Langer MN, Blodkamp S, Bayerbach M, Feßler AT, de Buhr N, Gutschmann T, Kreienbrock L, et al. 2017.** Testing cathelicidin susceptibility of bacterial mastitis isolates: Technical challenges and data output for clinical isolates. Vet Microbiol 210: 107-115. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.08.022
 16. **Machado SG, Baglinière F, Marchand S, Van Coillie E, Vanetti MC, De Block J, Heyndrickx M. 2017.** The biodiversity of the microbiota producing heat-resistant enzymes responsible for spoilage in processed bovine milk and dairy products. Front Microbiol 8: 302. doi: 10.3389/fmicb.2017.00302
 17. **Machado SG, da Silva FL, Bazzolli DM, Heyndrickx M, Costa PM, Vanetti MC. 2015.** *Pseudomonas* spp. and *Serratia liquefaciens* as predominant spoilers in cold raw milk. J Food Sci 80: M1842-M1849. doi: 10.1111/1750-3841.12957

18. **Marques VF, Motta CC, Soares BD, Melo DA, Coelho SM, Coelho ID, Barbosa HS, et al. 2017.** Biofilm production and beta-lactamic resistance in Brazilian *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Braz J Microbiol* 48: 118-124. doi: 10.1016/j.bjm.2016.10.001
19. **Naushad S, Naqvi SA, Nobrega D, Luby C, Kastelic JP, Barkema HW, De Buck J. 2019.** Comprehensive virulence gene profiling of bovine non-aureus staphylococci based on whole-genome sequencing data. *mSystems* 4: e00098-18. doi: 10.1128/mSystems.00098-18
20. **Ouamba AJK, Gagnon M, LaPointe G, Chouinard PY, Roy D. 2022.** Graduate student literature review: farm management practices: potential microbial sources that determine the microbiota of raw bovine milk. *J Dairy Sci* 105: 7276-7287. doi: 10.3168/jds.2021-21758
21. **Pereyra EA, Picech F, Renna MS, Baravalle C, Andreotti CS, Russi R, Calvino LF, et al. 2016.** Detection of *Staphylococcus aureus* adhesion and biofilm-producing genes and their expression during internalization in bovine mammary epithelial cells. *Vet Microbiol* 183: 69-77. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.12.002
22. **Pinilla G, Bautista A, Cruz C, Chavarro B, Navarrete J, Muñoz L, Gutiérrez J. 2017.** Determinación de factores de adhesión asociados a la formación de biopelícula en aislamientos clínicos de *Staphylococcus Aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. *NOVA* 15: 67-75. doi: 10.22490/24629448.1959
23. **Quigley L, O'Sullivan O, Stanton C, Beresford TP, Ross RP, Fitzgerald GF, Cotter PD. 2013.** The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol Rev* 37: 664-698. doi: 10.1111/1574-6976.12030
24. **Sánchez P, Gutiérrez M, Posada IJ. 2018.** Prevalencia de mastitis bovina en el Cañón de Anaime, región lechera de Colombia, incluyendo etiología y resistencia antimicrobiana. *Rev Inv Vet Perú* 29: 226-239. doi: 10.15381/rivep.v29i1.14084
25. **Schmoor C, Sauerbrei W, Schumacher M. 2000.** Sample size considerations for the evaluation of prognostic factors in survival analysis. *Stat Med* 19: 441-452. doi: 10.1002/(sici)1097-0258(20000229)19:4<441::aid-sim349>3.0.co;2-n
26. **Shahid M, Cavalcante PA, Knight CG, Barkema HW, Han B, Gao J, Cobo ER. 2020.** Murine and human cathelicidins contribute differently to hallmarks of mastitis induced by pathogenic *Prototheca bovis* algae. *Front Cell Infect Mi* 10: 31. doi: 10.3389/fcimb.2020.00031
27. **Sharun K, Dhama K, Tiwari R, Gugjoo MB, Iqbal Yattoo M, Patel SK, Pathak M, et al. 2021.** Advances in therapeutic and management approaches of bovine mastitis: a comprehensive review. *Vet Q* 41: 107-136. doi: 10.1080/01652176.2021.1882713
28. **Torres MDT, Sothiselvam S, Lu TK, de la Fuente-Nunez C. 2019.** Peptide design principles for antimicrobial applications. *J Mol Biol* 431: 3547-3567. doi: 10.1016/j.jmb.2018.12.015
29. **Valero-Leal K, Rivera-salazar J, Briñez W. 2017.** Capacidad de formación de biopelícula y limo en *Staphylococcus* que causan mastitis subclínica bovina en el estado Zulia-Venezuela. *Kasmera* 45: 24-32.