

Actividad antioxidante en bacterias causantes de mastitis clínica y subclínica en vacas mestizas de raza Carora y su relación con el conteo electrónico de células somáticas

Antioxidant capacity in microorganisms causing clinical and subclinical mastitis in raza carora mestized cows and its relationship with the electronic counting of somatic cells

^{1,2}Aranguren-Parra Aleidy J; ⁶Paredes Méndez Mariana; ⁴Torres Marcano Audrey H; ⁵González Pérez Zuleima del C, ^{1,3*}Márquez Alvarado Ysabel C.

¹Unidad de Investigación en Ciencias Funcionales "Dr. Haity Moussatche" y ²Área de Biología Celular y Molecular y ³Área de Fisiología Veterinaria y ⁴Área de Sistemas de Producción Animal y ⁵Laboratorio de Bromatología de los alimentos, todos del Decanato de Ciencias Veterinarias Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (UCLA). ⁶Unidad Educativa Colegio San Vicente de Paul.

Barquisimeto, Venezuela. E-mail: ^{1,3*}isabelmarquez@ucla.edu.ve, Orcid 0000-0003-1247-4839, Teléfono: 0251-2592630,

^{1,2}aleidyaranguren@ucla.edu.ve, Orcid 0000-0002-8347-6009 ⁶marianampmjs1@gmail.com, Orcid 0000-0003-2556-012X

⁴audreytorres@ucla.edu.ve, Orcid 0000-0001-9637-9278 ⁵zuleimagnz@hotmail.com, Orcid 0000-0001-7594-9016

RESUMEN

Las bacterias en glándula mamaria elevan las CS, 90% son neutrófilos de función fagocitaria liberando enzimas, mediadores inflamatorios y especies reactivas del O₂. La superóxido dismutasa (SOD-CuZn) contrarresta estas especies, producidas por las células blancas lácteas. El objetivo del estudio fue determinar la SOD en bacterias causantes de mastitis clínica y subclínica. Seleccionadas 20 vacas Carora-Holstein con mastitis en los primeros 20 días postparto: 15 con mastitis subclínica y 5 con mastitis clínica, la primera determinada por la prueba de California, confirmada por recuento electrónico de CS y la mastitis clínica con la prueba de fondo negro, antes del ordeño. Identificadas las cepas bacterianas se dosó la SOD en U/mL. Se aislaron 6 cepas de *Staphylococcus sp* cuya SOD fue 46,27±5,08; 4 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* con 139,59±4,73; 3 cepas de *Bacillus sp* con: 36,24±0,71; 2 cepas de *Streptococcus uberis* con 39,01±0,71; 2 cepas de *Streptococcus dysgalactiae* con 23,54±0,38; 2 cepas de *Corynebacterium sp* con 117,92±0,71 y 1 cepa de *E. coli* con 122,43. Los resultados indican que la *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium sp* y *E. coli* tienen una mayor actividad de la SOD, lo que indicaría que poseen un sistema antioxidante eficiente para evadir el estallido respiratorio de las células blancas lácteas, favoreciendo la evolución del proceso inflamatorio en la glándula mamaria. **Palabras clave:** SOD, mastitis, bacterias, vacas Carora.

ABSTRACT

The bacterium in mammary gland raise CS, 90% are neutrophils with a phagocytic function, releasing enzymes, inflammatory mediators and reactive O₂ species. Superoxide dismutase (SOD-CuZn) counteracts these species, produced by white milk cells. The objective of the study was to determine the SOD in bacteria that cause clinical and subclinical mastitis. Selected 20 Carora-Holstein cows with mastitis in the first 20 days postpartum: 15 with subclinical mastitis and 5 with clinical mastitis, the first determined by the California test, confirmed by electronic SC count and clinical mastitis with the black background test, before milking. Once the bacterial strains were identified, the SOD was measured in U/mL. 6 *Staphylococcus sp* strains were isolated, whose SOD was 46.27±5.08; 4 strains of *Pseudomonas aeruginosa* with 139.59±4.73; 3 strains of *Bacillus sp* with: 36.24±0.71; 2 strains of *Streptococcus uberis* with 39.01±0.71; 2 strains of *Streptococcus dysgalactiae* with 23.54±0.38; 2 strains of *Corynebacterium sp* with 117.92±0.71 and 1 strain of *E. coli* with 122.43. The results indicate that *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium sp* and *E. coli* have a higher activity of SOD, which would indicate that they have an efficient antioxidant system to avoid the respiratory burst of white milk cells, favoring the evolution of the inflammatory process in the mammary gland. **Keywords:** SOD, mastitis, bacteria, Carora cows.

Recibido: 05-05-2021

Aceptado: 15-06-2021

INTRODUCCIÓN

La mastitis es una patología compleja, multifactorial en la cual interactúan el medio ambiente, el huésped susceptible y los microorganismos patógenos capaces de producir infecciones intramamarias. Se han identificado más de 140 microorganismos que causan mastitis; los cuales reciben varias clasificaciones, según la respuesta inmune que induce se clasifican en patógenos mayores y patógenos menores. Los patógenos mayores incluyen *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Actinomyces pyogenes*, y otras bacterias como *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* y *Enterobacter spp.* Los patógenos menores incluyen *Mycoplasma spp.*, *Pasteurella spp.*, *Nocardia spp.*, *Listeria spp.* y algunos hongos y levaduras, entre otros [1, 2].

Los microorganismos que más comúnmente se conocen como causantes de mastitis son: *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium bovis* y algunas especies de *Mycoplasma*; a estos también se les conocen como microorganismos contagiosos ya que los mismos tienen como reservorio la glándula mamaria y se transmiten durante el ordeño, se han adaptado a las condiciones de la ubre y evaden el sistema inmune; suelen estar asociados a mastitis subclínicas [3, 4, 5].

Otras especies patógenas que podemos encontrar causando mastitis son los géneros de *Staphylococcus* coagulasa negativa (SCN), *Streptococcus* ambientales y en menor medida los coliformes, conocidos también como microorganismos ambientales, ya que su reservorio es el ambiente donde permanecen los animales y no las glándulas mamarias infectadas [6]. Los microorganismos que causan mastitis varían ampliamente entre países, regiones, fincas y de un momento a otro dentro de una finca, además la mastitis puede estar influenciada por el tipo de ordeño, todo esto hace

necesario, conocer la realidad de cada finca lechera, para de esta forma implementar programas de control de acuerdo a los problemas específicos [7].

Una vez que la bacteria vence la primera línea de defensa, representada por las barreras físicas de la glándula mamaria (la piel de los pezones, el músculo esfínter del pezón y el tapón de queratina), comienza a colonizar el tejido mamario y se inicia la respuesta inflamatoria, mediada por la respuesta celular. Es bien conocido que la secreción láctea posee normalmente un recurso celular defensivo formado por: macrófagos, polimorfonucleares neutrófilos, linfocitos y, en menor medida, células epiteliales, conocido en su conjunto como células somáticas (CS) [8].

Se ha demostrado que ante una infección intramamaria los neutrófilos, se incrementan considerablemente en la secreción láctea, en un periodo de 12–24 horas y su principal función es la fagocitosis y la destrucción de los microorganismos [9]. Esta destrucción es llevada a cabo por mecanismos independientes y dependientes del oxígeno, este último, involucra la formación de especies reactivas del oxígeno, que son una forma de radicales libres, entre los cuales se encuentra el anión superóxido [10].

Los organismos vivos aeróbicos como las bacterias y las células eucariotas poseen sistemas antioxidantes, entre estos se encuentran el sistema de la enzima superóxido dismutasa (SOD) formado por un grupo de metaloenzimas que usan un metal redox activo para dismutar dos moléculas de anión superóxido a oxígeno y peróxido de hidrógeno, la última de las cuales es eliminada por la catalasa y las enzimas peroxidasa [11]. La SOD poseen tres familias distintas, una familia de SOD Mn y Fe⁺⁺ (que utilizan como cofactor el metal), una familia Cu/Zn SOD que usa Cu⁺ para la catálisis y una familia rara de Ni SOD [12].

En bacterias la nomenclatura usada para la enzima SOD es SodA, SodB y SodC correspondiente a las SOD Mn, Fe y Cu/Zn, respectivamente la SodA y SodB se ubican en el interior de las bacterias y su función es eliminar las fuentes intracelulares o metabólicas de anión superóxido, por su parte la SodC se ubica en el espacio periplásmico/extracelular y su función es combatir directamente el superóxido del huésped animal [13]. Por lo antes mencionado se planteó como objetivo determinar la actividad antioxidante de la SOD Cu/Z (SodD) de las bacterias causantes de mastitis clínica y subclínica en vacas mestizas de la raza Carora y su relación con el recuento electrónico de células somáticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población y manejo

Los animales utilizados fueron vacas (*Bos taurus*) de alto mestizaje de la raza Carora pertenecientes a una explotación comercial ubicada en el caserío Morón en el municipio Jiménez del Estado Lara en Venezuela, a 9°55'11" de latitud y 69°37'39" de longitud y una altitud de 682. m.s.n.m. El clima es cálido, característico de bosque muy seco premontano de acuerdo a la clasificación Holdridge [14].

La explotación comercial maneja un sistema de tipo intensivo y las vacas se mantuvieron bajo las condiciones de manejo de la finca. La población estuvo representada por las vacas, de alto mestizaje Carora-Holstein, que se encontraran en los primeros 20 días postparto, con más de una lactancia y como criterio de exclusión: vacas que hayan sido diagnosticadas previamente con alguna patología (como por ejemplo enfermedad podal, metritis, retención de membranas fetales, hipocalcemia y mastitis clínica), así como también se excluyeron las vacas que estaban recibiendo tratamiento con cualquier antimicrobiano al momento del experimento, la muestra quedó conformada por 20 vacas.

Toma de muestras

A las 20 vacas se les realizó la prueba de fondo negro (PFN) las que resultaron positivas al fondo negro, formaron el grupo de vacas con mastitis clínica y se les tomo una muestra de 5 ml de leche del cuarto afectado en un recipiente estéril, para la identificación del patógeno, mientras que las negativas al PFN se les realizó la prueba del California mastitis test (CMT) para determinación de mastitis subclínica. Las vacas del grupo de mastitis subclínica les fue tomada dos muestras de leche; una de 50 ml recibida en un recipiente limpio para determinación del recuento electrónico de células somáticas y otra de 5 ml en un recipiente estéril para la determinación bacteriológica del agente patógeno causante de mastitis. Todas las muestras fueron refrigeradas a 4°C hasta el momento de su procesamiento en los laboratorios de Bromatología de los alimentos y Bacteriología del Decanato de Ciencias Veterinarias de la UCLA y fueron procesadas antes de las 24 horas.

Cuantificación de células somáticas

El Recuento de Células Somáticas (RCS), se realizó en las muestras de animales con mastitis subclínica y en las negativas, se tomó para esta determinación 50 mL de leche, la cual mantenida en una temperatura de aproximadamente de 4 a 5 °C hasta que llegaron al laboratorio de bromatología de los alimentos del DCV de la UCLA y fueron procesadas en un lapso no mayor a 36 horas, la determinación se realizó mediante el recuento electrónico de células somáticas a través del Fossomatic Minor®, según las recomendaciones de la Federación Internacional de Lecherías 1984.

Determinación microbiológica del agente patógeno

Las muestras para la determinación del agente causal de mastitis fue tomada de forma aséptica, según las recomendaciones del

Consejo Nacional de Mastitis (NMC por sus siglas en inglés) [15]. Se trasladaron en una cava con geles refrigerados, en una temperatura de entre 4 a 5°C, hasta el laboratorio de diagnóstico Microbiológico del Decanato de Ciencias Veterinarias (DCV) de la Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado” (UCLA), donde fueron procesadas según las recomendaciones del NMC [16]. Una vez identificado el patógeno, las colonias bacterianas eran enviadas disueltas en 2 mL de un medio de transporte líquido (infusión cerebro-corazón o BHI (por sus siglas en inglés) hasta el laboratorio de la Unidad de Investigación Dr.H.Moussatché (UNIHM) del DCV de la UCLA, para su procesamiento.

Determinación de la Actividad Antioxidante de la enzima superóxido dismutasa CuZn (SOD-CuZn) de las bacterias

La actividad antioxidante de la enzima SOD de las bacterias que causan mastitis se midió a través de un kit comercial (Cayman®-Chemical Company Ann Arbor, MI, USA). Los resultados se expresan en U de SOD/mL de suspensión bacteriana.

Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados con estadística descriptiva (frecuencia absoluta, promedio (\bar{X}) y desviación estándar (DE).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Recuento electrónico de células somáticas en leche

Los resultados del CMT fueron validados mediante el recuento electrónico de células somáticas, los valores del promedio de las 15 muestras de leche con mastitis subclínica analizadas se muestran en la Tabla I.

Los resultados de esta investigación indican que el CMT es una buena prueba para la determinación de mastitis subclínica los resultados del recuento electrónico de células somáticas concuerdan con los resultados del CMT [17, 18].

Resultados de microbiología

Los resultados del cultivo bacteriológico de las muestras de leches analizadas, arrojaron que 20 muestras resultaron positivas al cultivo bacteriano 5 con mastitis clínica y 15 con mastitis subclínica, los microorganismos se muestran en la Figura 1. La bacteria aislada con mayor frecuencia fue el *Staphylococcus spp* seguido de la *Pseudomona aeruginosa*, todos los microorganismos aislados fueron microorganismos ambientales.

Resultados de la actividad de la enzima SOD en bacterias causantes de mastitis

En lo que respecta a la actividad antioxidante de la enzima SOD en las bacterias se muestra en la Tabla II.

Por su parte los resultados sobre la actividad de la enzima SOD-CuZn (SodC) en las bacterias que causan mastitis se observó que la *Pseudomona aeruginosa*; el *Corynebacterium spp.*, la *Escherichia coli* presentaron una mayor actividad antioxidante que el resto de las bacterias aisladas, aun cuando existen pocos resultados sobre la actividad antioxidante en bacterias, sin embargo, están bien identificada la presencia de dicho sistemas antioxidantes en estas especies bacterianas, uno de los primeros microorganismos en los cuales se determinó la presencia de la SodC fue en *E. coli* [19]. Existen serotipo de *E. coli* (O257:H7 entero patógeno) altamente virulento, que tiene genes adicionales de SodC, denominado SodC-F el cual es superior a la SodC cromosómica en términos de resistencia a la proteasa y mayor estabilidad para la unión a Cu [20]. Lo cual protege eficazmente a las

bacterias de la muerte fagocítica, y modula la supervivencia bacteriana dentro de las células epiteliales, donde la destrucción bacteriana parece estar mediada por una NAD (P) H oxidasa que se asemeja al complejo enzimático típico de los fagocitos [21]. También se ha demostrado que en algunas especies de *Corynebacterium* y en *Pseudomona aeruginosa* presentan SodC que les ayuda a protegerse contra el superóxido generado externamente por las células huésped de los mamíferos [22].

Es bien conocido que durante la mastitis las células blancas producen grandes cantidades de ERO lo cual genera un estado de estrés oxidativo como respuesta celular ante el microorganismo causante del estado inflamatorio [23, 24]. En algunas investigaciones se ha demostrado como los parámetros de estrés oxidativos en la leche de vacas con mastitis se encuentran incrementados cuando se comparan con los resultados de la leche de vacas sanas [25, 26]. Estos altos niveles tanto de parámetros de estrés oxidativos como lo son los niveles de Dienes conjugados y malondialdehído en la leche de vacas con mastitis subclínica y clínica, nos indican que los PMN están cumpliendo su función fagocítica, que la producción de ERO con el estallido respiratorio, está atacando a las bacterias para su eliminación [27].

Los resultados de esta investigación dan un indicio de cómo se funcionan los sistemas antioxidantes o de defensa de los microorganismos causantes de mastitis. Así mismo las bacterias *Corynebacterium spp.* *Pseudomona aeruginosa* y *E. coli* presentan una actividad de la SOD-CuZn eficiente para evadir el estallido respiratorio de las células blancas presentes en la leche lo que las protege eficazmente de la muerte por fagocitosis, este hecho favorece la evolución del proceso inflamatorio y evolución de la mastitis.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Ericsson H; Lindberg A; Persson K; Ekman T; Artursson K; Nilsson OM et al. Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent-specific risk factors. Vet. Microbiol. 2009; 137 (1-2):90-97.
- [2] Trujillo CM, Gallego AF. Ramírez N, Palacio LG. Prevalencia de mastitis en siete hatos lecheros del oriente antioqueño. Rev. Colom. Cienc. Pec. 2011; 24 (1):11-18.
- [3] Bradley AJ, Green MJ. Adaptation of *Escherichia coli* to the bovine mammary gland. J Clin Microbiol. 2001; 39(5):1845-1849
- [4] Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. Medicina Veterinaria. Mastitis Bovina. Edit. Mcgraw-hill. 9o Edición. Vol 1. Madrid, España. 2002 p 728- 810
- [5] Guinane CM, Ben Zakour N, Tormo-Mas MA, Weinert LA, Lowder BV, Cartwright RA et al. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus* reveals insights into the origin and molecular basis of ruminant host adaptation. Genome Biol. Evolut. 2010; 2:454-466
- [6] Soca PM, Suárez YE, Soca PM, Rivero J, Fuentes CM, Alberto PC. Comparación de la incidencia epizootiológica de la mastitis clínica en dos rebaños lecheros después del uso del agua para la antisepsia final del pezón. Rev. Electrónica Vet. 2005; VI, (3) 1-11.
- [7] Faría J, Valero K, D'Pool G, García A, Allara M, Morales D. Agentes bacterianos y conteo de células somáticas en leche de cuartos de bovinos mestizos doble propósito ordeñados en forma manual o mecánica en cuatro fincas lecheras del estado Zulia, Venezuela. Rev. Científ. FCV-LUZ. 2005; 15(1): 64-71.
- [8] Meglia GE, Mata HT. Mecanismos específicos e inespecíficos de defensa, con referencia a la glándula mamaria de los bovinos productores de leche. Facultad de Ciencias Veterinarias. La Pampa Argentina 2001. Disponible en URL: http://www.produccionanimal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovi

nos leche/10-

Inmunidad en glandula mamaria.pdf.

Consultado el 20 de noviembre de 2012.

[9] Craven N, Williams MR. Defenses of the bovine mammary gland against infection and prospects for their enhancements. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1985; 10: 71-127.

[10] Babior BM. The respiratory burst of phagocytes. *J Clin. Invest.* 1984; 73:599-601.

[11] Broxton CN, Culotta VC. SOD enzymes and microbial pathogens: Surviving the oxidative storm of infection. *PloS. Pathog.* 2016; 12(1):e1005295. doi:10.1371/journal.ppat.1005295.

[12] Sheng Y, Abreu IA, Cabelli DE, Maroney MJ, Miller AF, Teixeira M. Superoxide dismutases and superoxide reductases. *Chem. Rev.* 2014; 114(7):3854-3918.

[13] Troxell B, Xu H, Yang XF. *Borrelia burgdorferi*, a pathogen that lacks iron, encodes manganese-dependent superoxide dismutase essential for resistance to streptonigrin. *J. Biol. Chem.* 2012; 287(23):19284-19293.

[14] Ewel JJ, Arnold M, Tosi JP. Zonas de Vida de Venezuela. En: Memoria Explicativa sobre el Mapa Ecológico. Ministerio de Agricultura y Cría. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias. República de Venezuela (Ed), Editorial Sucre, Caracas, Venezuela. Capítulo 9: Bosque seco premontano. 1976; 125-137. 2da Ed

[15] Consejo Nacional de Mastitis. Conceptos actuales de mastitis. Fount. Fourth Edition. 1996; Cap. 1, 3, 8, 11: 1.

[16] Harmon RJ, Eberhart RJ, Jasper DE, Langlois BE, Wilson RA. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection. *Natl. Mastitis Counc., Inc., Arlington, VA.* 1990.

[17] André MJ, Andrighetto C, Brazón MR, Correa RC, Galhardo DG, Piccinin A. et al. Correlação entre o California Mastitis Test (CMT) e a contagem de células somáticas

(CCS) do leite de búfalas Murrah. *Rev. Brasil. Zootec.* 2005; 34(6):2039-2045.

[18] Echeverri JJ, Jaramillo MG, Restrepo LF. Evaluación comparativa de dos metodologías de diagnóstico de mastitis en un hato lechero del Departamento de Antioquia. *Rev. Lasallista Investigac.* 2010; 7(1):49-57.

[19] Benov LT, Beyer WF, Stevens RD, Fridovich I. Purification and characterization of the Cu,Zn SOD from *Escherichia coli*. *Free Radic. Biol. Med.* 1996; 21:117-121.

[20] D'Orazio M, Scotti R, Nicolini L, Cervoni L, Rotilio G, Battistoni A et al. Regulatory and structural properties differentiating the chromosomal and the bacteriophage-associated *Escherichia coli* O157:H7 Cu, Zn superoxide dismutases. *BMC Microbiol.* 2008; 8:166 <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-166>

[21] Battistoni A. Role of prokaryotic Cu, Zn superoxide dismutase in pathogenesis. *Bioch.Soc.Trans.* 2003; 31(6):1326-1329.

[22] Trost E, Götter S, Schneider J, Schneiker-Bekel S, Szczepanowski R, The complete genome sequence of *Corynebacterium*. *BMC* 2010; Genomics volume 11, Article number: 728.

[23] Gu BB, Zhu YM, Zhu W, Miao JF, Deng YE, Zou SX Retinoid protects rats against neutrophil-induced oxidative stress in acute experimental mastitis. *Intern. Immunopharmacol.* 2009; 9:223-229.

[24] Abd Ellah, Abd Ellah MR. Role of free radicals and antioxidants in mastitis. *J Adv.Vet. Res.* 2013; 3:1-7.

[25] Ibrahim HMM, El-seedy YY, Gomaa NA. Cytokine response and oxidative stress status in dairy cows with acute clinical mastitis. *J Dairy Vet. Anim. Res.* 2016; 3(1):9-13. DOI: 10.15406/jdvar.2016.03.00064

[26] Aranguren-Parra AJ, Flores CA, Meléndez CE, Márquez YC, López-Ortega AA. Estrés oxidativo y actividad antioxidante en leche de vacas con mastitis subclínica. *Rev. vet.* 2017; 28(2):103-107.

[27] Schuster DE, Lee EK, Kehrlí ME. Bacterial growth, inflammatory cytokine production, and neutrophil recruitment during coliform mastitis in cows within ten days after calving, compared with cows at midlactation. *Am. J Vet. Res.* 1996; 57:1569-1575.

Actividad antioxidante en bacterias causantes de mastitis clínica y subclínica.

	RECS (células/mL de leche)	Rango
CMT +	1.744.571	565.000 – 4.194.000

Tabla I. Recuento electrónico de células somáticas en muestras de leche de vacas mestizas Carora-Holstein con mastitis subclínica.

Los valores de RECS representan el $\bar{X} \pm DE$

Figura 1. Microorganismos aislados de muestras de leche con mastitis

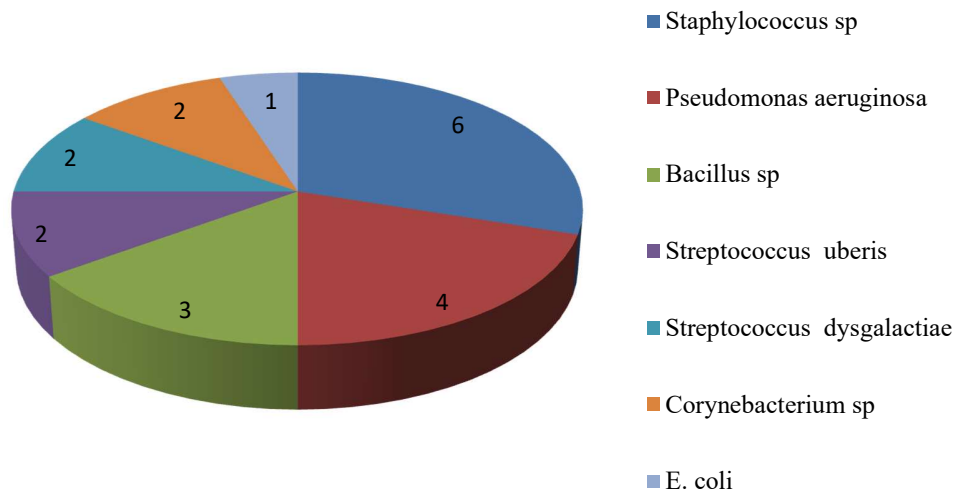


Tabla II. Actividad de la enzima SOD en bacterias causante de mastitis bovina

Microorganismo	Actividad de la SOD expresada en U/mL
<i>Staphylococcus sp</i>	46,27±5,08
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	139,59±4,73
<i>Bacillus sp</i>	36,24±0,71
<i>Streptococcus uberis</i>	39,01±0,71
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	23,54±0,38
<i>Corynebacterium sp</i>	117,92±0,71
<i>E. coli</i>	122,43

Los resultados son el promedio±DE para cada cepa bacteriana