



**universidad
de león**

TESIS DOCTORAL

EVALUACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS INDUCIDA POR ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS EN EL TRATAMIENTO DE MAMITIS EN GANADO BOVINO

EVALUATION OF THE RELEASE OF BACTERIAL ENDOTOXINS INDUCED BY ANTIBIOTICS USED IN THE TREATMENT OF MASTITIS IN CATTLE

Pablo Flórez Magadán

Director: Ana M. Carvajal Urueña

Programa de Doctorado en Ciencias Veterinarias y de los Alimentos

Departamento de Sanidad Animal

Facultad de Veterinaria

León, 2024

“Caminante, no hay camino, se hace camino al andar”

Antonio Machado

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, deseo expresar mi agradecimiento a la directora de esta tesis doctoral, la Dra. Ana Carvajal, por la dedicación y apoyo que ha brindado a este trabajo, por el ánimo constante que me ha transmitido a lo largo de mi vida, por ser una inspiración contante en la que fijarse como modelo de superación, conocimiento, trabajo y humanidad. Gracias por la confianza ofrecida y el empeño en ayudarme en todos y cada uno de los retos que te he propuesto.

Asimismo, agradezco al Dr. José Manuel Gonzalo su apoyo personal y humano, por su amistad incondicional, con quien comparto proyectos e ilusiones, sin olvidarme de sus Padres, el Dr. José Manuel Gonzalo Cordero y la Dra. M^a Asunción Orden Recio, gracias por dedicarme tiempo y ayuda cuando lo necesitaba, gracias por los conocimientos que me transmitisteis, no sólo para ejercer como Veterinario, sino también en otros muchos aspectos más cotidianos.

Un trabajo de investigación es siempre fruto de ideas, proyectos y esfuerzos previos, que corresponden a muchas personas y, en este caso, mi más sincero agradecimiento a la Dra. María de Castro, compañera de trabajo de Agrovét, con cuyo trabajo estaré siempre en deuda, gracias por tu amabilidad para facilitarme el desarrollo del trabajo, tu tiempo y tus ideas. Y gracias también a todo el equipo de Agrovét porque, aunque el tiempo es lo que no nos sobra, siempre he dispuesto del que necesitaba para cada proyecto en el que me he embarcado, fuese de trabajo o personal.

Gracias a mi familia, a mis padres y a mis hermanos, gracias por vuestro apoyo, vuestro cariño, vuestra compañía, gracias por los maravillosos años que compartimos juntos, gracias por vuestro empeño en que llegásemos a cumplir nuestros sueños, gracias por vuestros sacrificios. Gracias de corazón, Charo, por ejercer de madre y preocuparte por todos nosotros.

Gracias a mis amigos, que siempre me han prestado un gran apoyo moral y humano, necesarios en los momentos difíciles de mi vida. Gracias por estar a mi lado.

Pero, sobre todo, gracias a mi esposa Beatriz y a mis hijos, Elisa, Marcos y Mireia, por su paciencia, comprensión y solidaridad conmigo, por el tiempo que me han concedido, una vez más, un tiempo robado a la historia familiar. Sin vuestro apoyo este trabajo nunca se habría terminado y, por eso, este trabajo es también vuestro.

A todos, muchas gracias.

PUBLICACIONES PRESENTADAS

La Tesis Doctoral con título “*EVALUACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS INDUCIDA POR ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS EN EL TRATAMIENTO DE MAMITIS EN GANADO BOVINO*” ha sido parcialmente incluida en dos publicaciones. A continuación, se detalla el nombre de los autores, referencia completa y fecha de publicación de las dos publicaciones que incluyen resultados de la presente Tesis Doctoral.

AUTORES: Pablo Flórez, María de Castro, David Rodríguez, José Manuel Gonzalo-Orden, Ana Carvajal

TITULO: Validation of a Kinetic Turbidimetric Assay Based on Limulus Amebocyte Lysate (LAL) for Assessing Endotoxin Activity in Cow Milk

REFERENCIA: Animals (Basel), Jan 27., 13 (3): 427

DOI: 10.3390/ani13030427

FECHA DE PUBLICACIÓN: 27 de enero de 2023

FACTOR DE IMPACTO (JCR-2022): 3,0 (Q1: 12 de 62 en Agriculture, Dairy & Animal Science)

AUTORES: Pablo Flórez, María de Castro, Antonio R. Zarza, José Manuel Gonzalo-Orden, Marta E. Alonso, Ana Carvajal

TITULO: Evaluación de la liberación de endotoxinas bacterianas inducida por antibióticos utilizados en el tratamiento de mastitis por bacterias Gram negativas en el ganado bovino

REFERENCIA: Boletín Anembe, 143

FECHA DE PUBLICACIÓN: 10 de noviembre de 2023

RESUMEN

La mastitis es una de las enfermedades más comunes en el ganado lechero y causa de importantes pérdidas económicas en el sector lácteo en todo el mundo, así como de efectos negativos sobre el bienestar animal. Se caracteriza por una reacción inflamatoria de la glándula mamaria que produce cambios significativos en la composición bioquímica de la leche, estando asociada principalmente a infecciones por bacterias, tanto Gram negativas como positivas. La liberación de endotoxinas asociada a la lisis bacteriana es un factor relevante en el curso clínico de la mastitis causada por bacterias Gram negativas y debe tenerse en cuenta en el manejo clínico de estas infecciones empleando antibióticos. Es por ello que la detección de endotoxinas en muestras de leche puede ser una herramienta de gran utilidad en la gestión de la mastitis en las explotaciones lecheras. De forma similar, el estudio de la cinética de inhibición de diferentes bacterias patógenas y de la cinética de liberación de endotoxinas tras la exposición a diferentes antibióticos puede proporcionar información de interés para el manejo clínico de esta importante enfermedad.

En esta Tesis Doctoral hemos optimizado un ensayo turbidimétrico cinético basado en lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) para la cuantificación de endotoxinas en muestras de leche, introduciendo en el procedimiento un pretratamiento de estas muestras mediante filtración a través de un filtro de polivinilo y dilución con el fin de minimizar las interferencias asociadas a esta compleja matriz. En una segunda etapa, hemos investigado, empleando esta técnica el efecto de algunos antibióticos empleados de forma habitual en el tratamiento de mastitis sobre el crecimiento bacteriano y la liberación de endotoxinas, empleando un sistema de cultivo en leche o cultivos mini-ubre que trata de reproducir las condiciones de la infección en la glándula mamaria.

La técnica de detección y cuantificación de endotoxinas optimizada fue validada siguiendo las indicaciones establecidas por las normas de la Organización Internacional de Normalización, empleándose para la determinación en muestras de leche procedentes de animales con mastitis clínica asociada a bacterias tanto Gram negativas como positivas, en muestras de leche de tanque y en leches comerciales. Nuestros resultados demuestran la robustez y utilidad de este ensayo para la cuantificación de endotoxinas en

un amplio rango de concentraciones, permitiendo identificar mamitis por coliformes en muestras de leche de animales con enfermedad clínica de la glándula mamaria, así como detectar endotoxinas en muestras de leche de tanque o incluso en algunas leches comerciales UHT (tratamiento a altas temperaturas).

El modelo experimental optimizado de cultivo en leche o cultivos mini-ubre permitió simular las condiciones de una infección intramamaria con dos especies de bacterias Gram negativas, previamente aisladas de leches de animales con mamitis, *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes*, y valorar el efecto de la exposición a cuatro antibióticos de uso habitual en el manejo de mamitis clínicas en ganado vacuno: bencilpenicilina, dihidroestreptomicina, cefalosporina y cefapirina. Se determinaron las cinéticas de inhibición de crecimiento y de liberación de endotoxinas en estos cultivos, comparándolas con las obtenidas en controles con idénticas condiciones, pero sin tratamiento antibiótico. Todos los antibióticos valorados, tal y como era de esperar, provocaron una reducción del crecimiento, más acentuado a partir de las 3-4 horas de exposición, aunque con diferencias en las cinéticas de inhibición en función del modo de acción. Además, todos los antibióticos generaron una liberación de endotoxinas en comparación con los controles que también varió en función del antibiótico. Así, la exposición a cefalosporinas se asoció a una muerte bacteriana más lenta y, al mismo tiempo, a una mayor liberación de endotoxinas, probablemente a consecuencia de fenómenos de filamentación bacteriana por cambios en la morfología de la membrana celular de las bacterias. Por el contrario, el tratamiento con dihidroestreptomicina combinó una rápida actividad bactericida con una liberación más reducida de endotoxinas, probablemente a consecuencia de una lisis celular rápida.

ABSTRACT

Mastitis is one of the most common diseases in dairy cattle and causes significant economic losses in the dairy industry worldwide, as well as negative effects on animal welfare. It is characterized by an inflammatory reaction of the mammary gland that produces significant changes in the biochemical composition of milk, being associated with infections by both Gram-negative and Gram-positive bacteria. The release of endotoxins associated with bacterial lysis is a key factor in the clinical course of mastitis caused by Gram-negative bacteria and should be taken into consideration when using antibiotics in the management of these infections. Therefore, the detection of endotoxins in milk samples would be of great interest in the management of bovine mastitis. Similarly, the study of the inhibition kinetics of different pathogenic bacteria as well as endotoxin release kinetics after exposure to different antibiotics would provide relevant information for the clinical approach of this important disease.

In this PhD thesis we have optimized a kinetic turbidimetric assay based on *Limulus* amoebocyte lysate (LAL) for the quantification of endotoxins in milk samples, introducing into the procedure a pre-treatment by filtration through a polyvinyl filter and dilution in order to minimize the interferences associated with this complex matrix. In a second stage, we have investigated, using this technique, the effect of some antibiotics commonly used in the treatment of bovine mastitis on bacterial growth and endotoxins release, using a milk culture system or mini-udder cultures which reproduce the conditions of the infection of the mammary gland.

The optimized endotoxin detection and quantification assay was validated following the indications established by the standards of the International Organization for Standardization and was used for the determination in milk samples from animals with clinical mastitis associated with both Gram-negative and Gram-positive bacteria, in bulk milk and in commercial UHT (ultra high temperature) treated milk. Our results demonstrate the robustness and usefulness of this assay for the quantification of endotoxins in a wide range of concentrations, allowing the identification of coliform mastitis in milk samples from animals with clinical mammary gland disease, as well as detecting endotoxins in bulk milk or even in some commercial milks.

The experimental model or mini-udder cultures allow the reenactment of the conditions of an intramammary infection with two species of Gram-negative bacteria, previously isolated from the milk of cows with mastitis, *Escherichia coli* and *Enterobacter aerogenes*, and to assess the effect of the exposition to four antibiotics commonly used in the management of clinical mastitis in cattle: benzylpenicillin, dihydrostreptomycin, cephalosporin and cephapirin. The kinetics of growth inhibition and endotoxin release were investigated in these cultures and compared with the kinetics determined in controls with identical conditions, but without antibiotic treatment. As expected, all antibiotics tested caused a significant reduction in growth, more pronounced after 3-4 hours of exposure, with differences in these inhibition kinetics depending on each antibiotic and its mode of action. Furthermore, all antibiotics produced a release of endotoxins compared to the controls which also varied depending on the antibiotic. Thus, exposure to cephalosporins was associated with a slower bacterial death and, at the same time, a greater release of endotoxins, probably as a result of bacterial filamentation phenomena due to changes in the morphology of the bacterial cell membrane. In contrast, dihydrostreptomycin combined a quick bactericidal activity with a reduced release of endotoxin, probably as a result of rapid cell lysis.

ABREVIATURAS

- ADN** Ácido desoxirribonucleico
ARN Ácido ribonucleico
ATP Adenosín trifosfato
AuNPs Nanopartículas de oro (*Au (gold) nanoparticles*)
bp par de bases (*base pair*)
bWBA Ensayo de sangre total bovina (*bovine whole blood assay*)
BP Bencilpenicilina
CD Clúster de diferenciación (*cluster of differentiation*)
CF Cefalosporina
CIs Células
CMI Concentración mínima inhibitoria
CMI₉₀ concentración mínima capaz de inhibir el crecimiento del 90 % de los aislados de una determinada especie bacteriana
CMT Test California para mastitis (*California mastitis test*)
CSY Cefapirina
CXCL-8 *CXC motif chemokine ligand 8*
DEP Diarrea epidémica porcina
E. coli *Escherichia coli*
EEUU Estados unidos (del inglés *United States*)
EIS Espectroscopía de impedancia electroquímica
EMPAS sensores acústicos piezoeléctricos electromagnéticos (*electrospun micropylramid arrays*)
EN: Norma Europea (*European norm*)
ENP Proteínas neutralizadoras de endotoxinas (*Endotoxin Neutralizing Proteins*)
E. aerogenes *Enterobacter aerogenes*
EU Unidades de endotoxina (*endotoxin units*)
rFC Factor recombinante C
FIL Federación Internacional de Lechería
IDF Federación Internacional de Lechería (*International Dairy Federation*)
IL Interleucina
ISO Organización Internacional de Normalización (*International Organization for Standardization*)
K. pneumoniae *Klebsiella pneumoniae*
LA-14-PP lípido A tetraacilado precursor Ia, compuesto 406 o también conocido como lípido Iva
LA-22-PP del inglés *violaceum-type lipid A*
LAL Ensayo de Límulus (*Limulus ameocyte lysate*)
LBP Proteína de unión al lipopolisacárido LPS (*lipopolysaccharide binding protein*)
LC Cristal líquido
LOD Límite de detección (*limit of detection*)
LPS Lipopolisacárido
M. bovis *Mycoplasma bovis*
MD-2 Proteína de diferenciación mieloide-2 (*Myeloid differentiation-2*)
OMV Vesículas de la membrana externa (*outer-membrane vesicles*)
OTS Triclorosilano octadecil (*octadecyltrichlorosilan*)
P. aeruginosa *Pseudomonas aeruginosa*

PBP Péptidoglicano-transpeptidasas (*Penicillin-binding proteins*)
PCR Reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*)
PGE2 Prostaglandina E2
PMB polimixina B (polymixin B)
pNA P-nitroanilina
PVDF polivinilideno de fluoruro
RCS Recuento de células somáticas
RPT Prueba de pirógenos en conejos (*Rabbit pyrogen test*)
S. marcescens *Serratia marcescens*
SPK muestra cebada con una concentración conocida de endotoxinas (*spike*)
SPR Resonancia de plasmón superficial (*surface plasmon resonance*)
ST Dihidroestreptomicina
STD patrón o estándar (*standard*)
S. aureus *Staphylococcus aureus*
S. agalactiae *Streptococcus agalactiae*
S. dysgalactiae *Streptococcus dysgalactiae*
S. uberis *Streptococcus uberis*
TNF- α Factor de necrosis tumoral alfa (*tumor necrosis factor-alpha*)
TRL *toll-like-receptor*
UFC Unidad formadora de colonias
UFOP sonda de fibra óptica doblada en U (*U fiber optic probe*)
UHT Uperizada (*ultrahigh temperature*)
UNE Asociación Española de Normalización

ÍNDICE

1- INTRODUCCIÓN	1
2- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
2.1- Mamitis bovina	9
2.1.1- Definición, etimología, clasificación e importancia de la mamitis bovina	9
2.1.2- Etiología de la mamitis bovina y clasificación de los patógenos mamarios	15
2.1.3- Principales patógenos mamarios Gram negativos: epidemiología y patogenicidad.....	19
2.2- Endotoxinas bacterianas	28
2.2.1- Biología de las endotoxinas bacterianas.....	28
2.2.2- Estructura y funcionalidad del lipopolisacárido.....	29
2.2.3- Efecto del lipopolisacárido sobre el hospedador.....	32
2.2.4- Signos clínicos relacionados con la endotoxemia.....	35
2.3- Liberación de endotoxinas inducida por antibióticos	39
2.4- Métodos de análisis para la detección y cuantificación de endotoxinas.....	42
2.4.1- Test de pirógenos en conejos	42
2.4.2- Ensayo en sangre total bovina.....	43
2.4.3- Ensayo con lisado de amebocitos de Limulus (LAL)	44
2.4.4- Nuevas técnicas para la detección de endotoxinas.....	49
3- OBJETIVOS	55
4- MATERIAL Y MÉTODOS.....	59
4.1- Detección y cuantificación de endotoxinas en muestras de leche.....	61
4.1.1- Toma de muestras y conservación	61
4.1.2- Determinación de la actividad de endotoxina	62
4.1.3- Validación del ensayo LAL en la matriz leche	72
4.2- Diagnóstico de mamitis en muestras de leche.....	78
4.2.1- Cultivo microbiológico de las muestras de leche.....	78
4.2.2- Recuento de células somáticas (RCS).....	85

4.3- Liberación de endotoxinas bacterianas inducida por antibióticos	87
4.3.1- Cultivos mini-ubre	87
4.3.2- Determinación de la cinética de crecimiento bacteriano	93
4.3.3- Determinación de la cinética de liberación de endotoxinas.....	93
4.4- Análisis estadístico	94
5- RESULTADOS	95
5.1- Optimización y validación del método turbidimétrico cinético LAL para la cuantificación de endotoxinas en muestras de leche.....	97
5.1.1- Efecto de la filtración.....	97
5.1.2-Curva de calibración, coeficientes de variación y tasa de recuperación	100
5.1.3-Validación del ensayo LAL optimizado en la matriz leche.....	103
5.1.4-Determinación de la actividad de endotoxinas en muestras de leche....	107
5.2- Empleo de un sistema de cultivo mini-ubre para el estudio de la liberación de endotoxinas inducida por antibióticos	113
5.2.1- Cinética de la inhibición del crecimiento bacteriano	113
5.2.2- Cinética de liberación de endotoxinas	116
6- DISCUSIÓN.....	123
7- CONCLUSIONES	139
8- BIBLIOGRAFÍA.....	143
9- ANEXO I: PUBLICACIONES	161

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales factores que contribuyen o predisponen a la mastitis bovina. Adaptado de Poutrel (1985).....	10
Figura 2. Origen de las células somáticas en leche a partir de la descamación de células del epitelio de los alveolos y conductos y del paso de células inflamatorias a partir de la sangre. Adaptado de Álvarez (2023)	12
Figura 3. Recuento de células somáticas (RCS) en el diagnóstico de mastitis subclínicas. Adaptado de Bach y McArt (2018)	13
Figura 4. Fuentes de infección y mecanismos de transmisión en las mastitis contagiosas y ambientales	17
Figura 5. Principales características de los aislados de <i>Escherichia coli</i> : Gram negativo (C) de morfología colibacilar (A y C) y provisto de flagelos peritricos (A). Genera colonias de color rosa (fermenta la lactosa) en medios como el agar McConkey (B) .	19
Figura 6: Morfología y características tintoriales (tinción de Gram) y crecimiento en agar tripton-soja de un aislado de <i>Enterobacter aerogenes</i>	27
Figura 7. Diferencias en la estructura de la pared celular de las bacterias Gram positivas y Gram negativas. Adaptado de Schaumberger y col. (2016)	29
Figura 8. Disposición y estructura de la molécula de lipopolisacárido (LPS) en la pared celular de las bacterias Gram negativas	30
Figura 9. Efectos biológicos del lipopolisacárido (LPS) sobre diferentes células del sistema inmunitario	33
Figura 10. Representación esquemática de los principales signos clínicos de la endotoxemia en el ganado bovino	36
Figura 11. Aspecto y distribución mundial del cangrejo de herradura (<i>Limulus polyphemus</i>) y de otros xifosuros	45
Figura 12. Cascada enzimática en la reacción que ocurre en el ensayo de Limulus amebocyte lysate (LAL). Adaptada de Williams (2007)	48
Figura 13. Validación interna del test turbidimétrico cinético para la determinación de la actividad de endotoxina siendo STD1: patrón de endotoxina de 50 unidades de endotoxina (UE)/ml, STD2: patrón de endotoxina de 5 UE/ml, STD3 patrón de endotoxina de 0,5 UE/ml, STD4 patrón de endotoxina de 0,05 UE/ml, CTRL1 agua libre de endotoxinas, SPK2 agua libre de endotoxina cebado con patrón de endotoxina con concentración final de 0,5 UE/ml	66

Figura 14. Diseño de una placa de 96 pocillos para el ensayo turbidimétrico cinético de Limulus amebocyte lysate (LAL) optimizado para la matriz leche, siendo STD los patrones de las concentraciones de 50 (STD 1), 5 (STD 2), 0,5 (STD 3) y 0,05 (STD 4) EU/ml, CTRL el blanco (agua libre de endotoxinas), M las muestras problema (M1, M2, M3...), siendo Mx500a la réplica 1 de la dilución 1:500 y Mx500b la réplica 2 de la dilución 1:500 y Mx1000a y Mx1000b las dos réplicas de dilución 1:1.000, SPL la muestra sin cebar y SPK la muestra cebada (spike)	67
Figura 15. Placa y lector empleados en el ensayo turbidimétrico cinético para la determinación de la concentración de endotoxinas en muestras de leche	69
Figura 16. Informe de resultados donde se muestra la recta patrón, así como los controles de calidad; coeficientes de variación (CV) entre réplicas de muestras y patrones, así como y entre muestras cebadas o spike (SPK). Se incluye un ejemplo de porcentaje de recuperación del 105 % en la muestra SPK	71
Figura 17. Test de catalasa y oxidasa para la identificación microbiana sobre colonias recuperadas en el cultivo microbiológico de muestras de leche bovina	80
Figura 18. Método de aislamiento selectivo en agar cromogénico: diluciones seriadas y siembra en profundidad para la realización del recuento microbiano en cada muestra de leche investigada	81
Figura 19. Crecimiento bacteriano en agar cromogénico. Las colonias de <i>Escherichia coli</i> se aprecian en color azul, mientras que las de otros coliformes aparecen en color rosa	82
Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % con los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). M: marcador de peso molecular; C-: control negativo; EM: muestra problema	84
Figura 21. Mecanismo de funcionamiento del sistema automático portátil DeLaval cell Counter DCC para el recuento de células somáticas	85
Figura 22. Sistema automático portátil DeLaval cell counter DCC para el recuento de células somáticas: cartucho (A) y lector (B)	86
Figura 23. Representación esquemática del proceso de recuento bacteriano y los posteriores cálculos para su expresión en unidades formadoras de colonias (UFC)/ml en una suspensión mediante la realización de diluciones seriadas. Adaptado de Madigan y col. (2019)	89

Figura 24. Placas empleadas para la determinación del recuento bacteriano en unidades formadoras de colonias (UFC)/ml mediante un sistema de dilución y siembra en placa	90
Figura 25. Diseño experimental para la simulación de las condiciones de la infección de la glándula mamaria por bacterias Gram negativas y del efecto del tratamiento con la concentración mínima que inhibe al 90 % de los aislados o CMI ₉₀ con cuatro antibióticos empleando cultivos mini-ubre	92
Figura 26. Determinación del efecto del tratamiento antibiótico sobre el crecimiento bacteriano y la liberación de endotoxinas mediante el empleo de cultivos mini-ubre ..	92
Figura 27. Curvas de calibración obtenidas con estándares de endotoxina de 50, 5, 0,5 y 0,05 unidades de endotoxina (EU) por ml no filtrados (A) y filtrados (B) a través de un filtro de polivinilideno de fluoruro (PVDF).	100
Figura 28. Ejemplo de recta de calibración y criterios de aceptación: linealidad de la recta ($R > 0,995$) y coeficiente de variación (CV) entre réplicas de los patrones inferior al 10 %. Las concentraciones de los patrones se expresan en unidades de endotoxina (EU) por ml.	101
Figura 29. Valores de porcentaje de recuperación de una concentración conocida de endotoxinas en muestras cebadas o “spike” (B). Se incluye un ejemplo de esta recuperación conforme los cálculos del software (A). Las concentraciones de endotoxinas se expresan en unidades de endotoxina (UE)/ml.	103
Figura 30. Correlación entre en el recuento de células somáticas (RCS) expresado en células (cls)/ml y la concentración de endotoxina expresada en unidades de endotoxina (EU)/ml en muestras de leche recuperadas de animales con mamitis clínica por bacterias Gram negativas.	111
Figura 31. Correlación entre en el recuento de células somáticas (RCS) y la concentración de endotoxina en muestras de leche recuperadas de animales con mamitis clínica por bacterias Gram negativas.	112

Figura 32. Cinética de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> (A) y <i>Enterobacter aerogenes</i> (B) en cultivos mini-ubre: control (●) tras el tratamiento con cefalosporina (CF: ■), cefapirina (CSY: ▼), becilpenicilina (BP: ○) y dihidroestreptomicina (ST: □). Se representa el logaritmo en base 10 del recuento bacteriano expresado en unidades formadoras de colonias (UFC)/ml frente al tiempo. Los valores mostrados en la figura son la media de tres réplicas experimentales.	116
Figura 33. Correlación entre en la concentración de endotoxina obtenida tras el tratamiento de sonicación y la concentración bacteriana en cultivos mini-ubre de <i>Escherichia coli</i>	119
Figura 34. Correlación entre en la concentración de endotoxina obtenida tras el tratamiento de sonicación y la concentración bacteriana en cultivos mini-ubre de <i>Enterobacter aerogenes</i>	119
Figura 35. Relación entre la concentración de endotoxina (unidades de endotoxina (UE)/ml) y la concentración bacteriana expresada como unidades formadoras de colonia (UFC)/ml determinada tras el tratamiento por sonicación durante 15 minutos de cultivos mini-ubre de <i>Escherichia coli</i> (●) y <i>Enterobacter aerogenes</i> (○).....	120
Figura 36. Porcentaje de liberación de endotoxinas en los cultivos de <i>Escherichia coli</i> (barras negras) y <i>Enterobacter aerogenes</i> (barras grises) tras el tratamiento con cefalosporina (CF), cefapirina (CSY), becilpenicilina (BP) y dihidroestreptomicina (ST) tras la exposición al antibiótico durante 6 horas. Los resultados mostrados son la media de tres réplicas y expresados en porcentaje respecto al total de endotoxina procedente del sumatorio de endotoxinas liberadas en todos los tratamientos.	122

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cebadores empleados para la identificación bacteriana mediante la amplificación de un fragmento de 350 pb del gen 16S ribosomal en los aislados bacterianos recuperados de casos de mamitis clínica	83
Tabla 2. Tiempos de reacción expresados en segundos de las cinéticas turbidimétricas de patrones y controles negativos (blancos) sin filtrar y tras la filtración utilizando el filtro de fluoruro de polivinilideno (PVDF). R1-R10: réplicas no filtradas; RF1-RF10: réplicas filtradas. Las concentraciones de los patrones se expresan en unidades de endotoxina (EU) por ml.....	99
Tabla 3. Valor medio de los coeficientes de variación (CV) entre las réplicas de los estándares de endotoxina (50, 5, 0,5 y 0,05 unidades de endotoxina (EU)/ml) y el blanco (agua ultrapura libre de endotoxinas) no filtrados y filtrados a través de filtro de polivinilideno de fluoruro (PVDF) obtenidos en la determinación de la actividad de endotoxina empleando un método turbidimétrico cinético.....	102
Tabla 4. Valor medio de los coeficientes de variación (CV) entre las réplicas de las muestras de leche obtenidos en la determinación de la actividad de endotoxina empleando un método turbidimétrico cinético.....	102
Tabla 5. Validación del ensayo turbidimétrico cinético <i>Limulus ameobocyte lysate</i> (LAL) para la cuantificación de endotoxinas en muestras de leche: resultados obtenidos con cinco réplicas procesadas por dos operadores sobre los estándares de endotoxina.....	105
Tabla 6. Validación del ensayo turbidimétrico cinético <i>Limulus ameobocyte lysate</i> (LAL) para la cuantificación de endotoxinas en muestras de leche: resultados obtenidos con cinco réplicas procesadas por dos operadores sobre una muestra de leche libre de endotoxinas suplementada con diferentes concentraciones de endotoxina.	106
Tabla 7. Validación global del ensayo turbidimétrico cinético <i>Limulus ameobocyte lysate</i> (LAL) para la cuantificación de endotoxinas en muestras de leche: resultados obtenidos con cinco réplicas procesadas por dos operadores sobre estándares de endotoxina y sobre muestras de leche libre de endotoxinas suplementadas con diferentes concentraciones de endotoxina.....	106
Tabla 8. Repetibilidad determinada para el ensayo turbidimétrico cinético <i>Limulus ameobocyte lysate</i> (LAL) para la cuantificación de endotoxinas en muestras de leche empleando muestras con elevada, moderada y baja concentración de endotoxina..	107

Tabla 9. Reproductibilidad determinada para el ensayo turbidimétrico cinético <i>Limulus</i> amebocyte lysate (LAL) para la cuantificación de endotoxinas en muestras de leche empleando muestras con elevada, moderada y baja concentración de endotoxina.....	108
Tabla 10. Concentración de endotoxinas expresadas en unidades de endotoxina (UE)/ml, recuento de células somáticas (RCS) expresado en células (cls)/ml y resultados de microbiología en muestras de leche recogidas en vacas con mamitis clínica.....	109
Tabla 11. Concentración de endotoxinas en las muestras de leche procedentes de animales con mamitis clínica asociada a bacterias Gram negativas....	110
Tabla 12. Concentración de endotoxinas expresadas en unidades de endotoxina (UE)/ml y recuento de células somáticas (RCS) expresado en células (cls)/ml en muestras de leche de tanques de leche.....	112
Tabla 13. Concentración de endotoxinas expresadas en unidades de endotoxina (UE)/ml en muestras de leche comercial UHT (uperizada o del inglés <i>ultrahigh temperature</i>).	113
Tabla 14. Cinética de inhibición del crecimiento en unidades formadoras de colonias (UFC)/ml en los cultivos mini-ubre tratados con antibióticos: bencilpenicilina (BP), cefapirina (CSY), dihidroestreptomicina (ST) y cefalosporina (CF), así como en el control sin antibióticos. A) <i>Escherichia coli</i> y B) <i>Enterobacter aerogenes</i>	115
Tabla 15. Concentración bacteriana expresada como unidades formadoras de colonias (UFC)/ml y concentración de endotoxinas en unidades de endotoxina (UE)/ml tras la lisis bacteriana inducida por sonicación en cultivos mini-ubre de <i>Escherichia coli</i> . La relación entre actividad de endotoxina y el recuento bacteriano se expresa como UE/UFC.....	117
Tabla 16. Concentración bacteriana expresada como unidades formadoras de colonias (UFC)/ml y concentración de endotoxinas en unidades de endotoxina (UE)/ml tras la lisis bacteriana inducida por sonicación en cultivos mini-ubre de <i>Enterobacter aerogenes</i> . La relación entre actividad de endotoxina y el recuento bacteriano se expresa como UE/UFC.	118

Tabla 17. Concentración de endotoxina liberada (unidades de endotoxina (UE)/ml) en los cultivos de *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes* tras el tratamiento con cefalosporina (CF), cefapirina (CSY), becilpenicilina (BP) y dihidroestreptomicina (ST) durante 6 horas. Para la determinación de la ratio EU/unidades formadoras de colonias (UFC) se tomaron los datos correspondientes a las EU/ml liberadas a tiempo final tras el tratamiento y el número de células bacterianas estimado como la diferencia entre el recuento en el punto máximo de crecimiento y al final del tratamiento. Los resultados mostrados son la media de tres réplicas experimentales..... 121

1- INTRODUCCIÓN

La mastitis es una de las enfermedades más comunes en el ganado bovino lechero y causa de importantes pérdidas económicas en el sector lácteo en todo el mundo, así como de efectos negativos sobre el bienestar animal. Se caracteriza por una reacción inflamatoria de la glándula mamaria que produce cambios significativos en la composición bioquímica de la leche y, en ocasiones, signos de enfermedad local y/o sistémica, estando asociada principalmente a infecciones por bacterias, tanto Gram negativas como positivas. Particularmente, las mastitis por bacterias Gram negativas cursan con una gran reacción inflamatoria, consecuencia de la liberación de endotoxinas asociada a la lisis bacteriana, siendo esta liberación el elemento principal en la patogenia de las mastitis producidas por estos microorganismos.

Las endotoxinas son macromoléculas conocidas como lipopolisacáridos o LPS y son el principal componente de la membrana externa de la pared celular de las bacterias Gram negativas. Si bien no son dañinas cuando se encuentran formando parte de la membrana celular, una vez liberadas, las endotoxinas son altamente inmunoestimulantes y, en gran medida, son responsables de los signos de infección bacteriana. Aunque existe una heterogeneidad en la composición de estos LPS entre diferentes géneros, especies, serogrupos y serotipos bacterianos, todos los LPS comparten una composición estructural común; están constituidos por un lípido (lípido A, parte inmunógena y de baja variabilidad) y un polisacárido (parte específica de especie y, por tanto, con alta variabilidad dependiente de la longitud de su cadena), siendo, como hemos indicado anteriormente, componentes fundamentales de la pared celular de las bacterias Gram negativas. Estas endotoxinas son conocidas por su efecto pirogénico y resisten altas temperaturas y así como un amplio rango de pH.

A nivel biológico las endotoxinas interactúan con los receptores de membrana de las células del sistema inmunitario innato, como los neutrófilos y los macrófagos, provocando la liberación de niveles exacerbados de citocinas mediadoras de la inflamación como las interleucinas (IL) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α). Estas endotoxinas se liberan en cantidades mínimas cuando las bacterias se multiplican, pero sufren un incremento considerable y perjudicial para el huésped cuando las bacterias se desintegran o mueren por diversas razones. Una elevada concentración de estas endotoxinas se asocia a una respuesta inmunitaria innata desproporcionada y perjudicial para el hospedador con consecuencias negativas a nivel local y sistémico (WycKoff y col., 1998).

Así pues, la liberación de endotoxinas asociada a la lisis bacteriana es un factor determinante en el curso de las mastitis producidas por bacterias Gram negativas y debe tenerse en consideración al seleccionar el antibiótico para el tratamiento de estas infecciones. El uso de antibióticos constituye la principal estrategia quimioterapéutica para el tratamiento de las mastitis, pero en el caso de las infecciones por Gram negativos se puede asociar a efectos adversos como consecuencia de la liberación de endotoxinas.

Entre los factores que afectan a esta liberación de endotoxinas inducida por antibióticos se encuentran el microorganismo implicado, la localización de la infección, la virulencia particular de la cepa, así como factores relacionados con el propio antibiótico como el mecanismo de acción, el modo de aplicación y la dosis empleada. Se ha descrito que, en función del modo de acción y dosis del antibiótico, así como de la carga o contaminación bacteriana de partida, se pueden producir diferentes cambios morfológicos en el microorganismo que repercutirán en mayor o menor medida en la liberación de endotoxinas (Eng y col., 1993). Así, se ha descrito las cefalosporinas, un tipo de antibióticos β -lactámicos, están relacionadas con fenómenos de filamentación bacteriana y, por lo tanto, con la liberación de niveles más altos de endotoxinas mientras que, por el contrario, otros antibióticos, incluidos también algunos β -lactámicos, son capaces de provocar una lisis celular rápida y, por lo tanto, la liberación de cantidades reducidas de endotoxina.

El diagnóstico de mastitis se realiza a través de la combinación de evidencias clínicas, incluidas las alteraciones en la composición y características de la leche, con cultivos microbiológicos que persiguen la identificación del patógeno implicado. La detección del microorganismo involucrado permite completar el diagnóstico con estudios de sensibilidad que permiten orientar el tratamiento, aunque presentan como inconveniente el retraso en el tiempo que impide reaccionar ante esta patología de forma temprana (May y col., 1989). La utilización de otras técnicas de detección de bacterias Gram negativas como las técnicas moleculares constituye, también, una herramienta muy útil en el diagnóstico de la enfermedad y la posterior evaluación del tratamiento. Hemos de resaltar que, habitualmente, los estudios de sensibilidad se realizan con inóculos de entre 10^4 y 10^6 unidades formadoras de colonias (UFC) por ml, una concentración claramente inferior a la que realmente se alcanza a nivel intramamario, por lo que utilizar modelos más próximos a la situación real, incorporando en ellos el efecto del tratamiento sobre la multiplicación bacteriana y la liberación de endotoxinas sería de gran interés.

Más aún, teniendo en cuenta la resistencia del LPS a las temperaturas elevadas y a las variaciones del pH podría utilizarse la determinación de estas endotoxinas en leche pasteurizada o uperizada (del inglés *ultrahigh temperature* o UHT) como marcador de su calidad microbiológica durante todo el proceso de producción, desde la granja y hasta el consumidor final.

Existen diferentes métodos para la detección y cuantificación de endotoxinas, muy desarrollados y validados en el ámbito de la industria farmacéutica dada la importancia de determinar estas endotoxinas en productos farmacológicos debido a su carácter pirógeno. Entre estos métodos destacan, particularmente, los basados en el lisado de amebocitos del cangrejo herradura *Limulus* (del inglés *Limulus amoebocyte lysate* o LAL), habiéndose descartado en la actualidad los métodos de ensayo sobre animales como el test de pirógenos en conejos (del inglés *rabbit pyrogen test* o RPT). Sin embargo, no existen metodologías normalizadas para la detección de endotoxinas en leche, siendo este uno de los objetivos de este trabajo.

Bajo estas premisas en este estudio presentamos los datos obtenidos en la validación de un ensayo turbidimétrico cinético basado en lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) para la cuantificación de endotoxinas en muestras de leche junto con los resultados obtenidos tras simular una infección intramamaria con dos especies Gram negativas, *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes*, empleando una concentración de inóculo cercano a la que se produce en la infección real de la glándula mamaria y su exposición a cuatro antibióticos, bencilpenicilina (BP), dihidroestreptomicina (ST), cefalosporina (CF) y cefapirina (CSY), determinando las cinéticas de inhibición de crecimiento y de liberación de endotoxinas en comparación con controles sin tratamiento antibiótico.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1- MAMITIS BOVINA

2.1.1- Definición, etimología, clasificación e importancia de las mamitis bovinas

La Federación Internacional de Lechería (FIL o *International Dairy Federation*, IDF en su abreviatura en lengua inglesa) define la mamitis como una reacción inflamatoria de la glándula mamaria (IDF, 1987a). Etimológicamente la palabra mamitis está compuesta del prefijo “masto”, del griego “μαστος” (mastos), mama o teta, y del sufijo “itis” del griego “ιτις”, que indica inflamación. Desde el punto de vista médico la definimos como la inflamación que produce cambios en el tejido glandular y, por consiguiente, una serie de variaciones en la composición físico-química de la leche que, en ocasiones, se manifiesta por un cambio en el aspecto de la leche, alteraciones en la glándula mamaria (signos de Celso o signos de inflamación) o, incluso, signos clínicos generales o sistémicos.

Partiendo de la base de esta definición primaria, existen muy diferentes enfoques que deben tenerse en cuenta para abordar el conocimiento de la mamitis bovina como son su etiología, epidemiología e incluso las formas de presentación y prevalencia/incidencia. Diversos autores califican a esta enfermedad como un proceso complejo, con participación de diferentes factores en su etiología o multifactorial y con muy diferentes grados de intensidad, así como variaciones en su duración y efecto a largo plazo. En la mamitis, al igual que en otras muchas enfermedades, es fundamental considerar la interacción entre animal, medio ambiente y microorganismos (Poutrel, 1985).

Aunque desde el punto de vista de su etiología, la inflamación de la glándula mamaria puede ser consecuencia de la acción de factores abióticos como traumatismos, lesiones en la ubre o irritaciones químicas, la gran mayoría de los casos son consecuencia de una multiplicación bacteriana. De hecho, la propia FIL define la mamitis bovina como una enfermedad infecciosa causada por microorganismos con diferentes características patológicas y que afecta a hospedadores bovinos, siendo la resistencia a la infección variable en función del individuo (IDF, 1978b). Así mismo, considera la mamitis como un desequilibrio entre los mecanismos de defensa naturales del pezón y de la glándula mamaria y la concentración y patogenicidad de los microorganismos en contacto con la entrada del canal del pezón, considerando la exposición al microorganismo como un requisito o causa necesaria pero no suficiente para el desarrollo del proceso. Factores externos o ambientales pueden romper este equilibrio y predisponer o contribuir a la

aparición de una mamitis bovina, encontrándose entre estos factores algunos como la higiene, la máquina de ordeño, el tipo de estabulación, el clima, la alimentación o el manejo, tal y como se muestra en la Figura 1 (Poutrel, 1985).

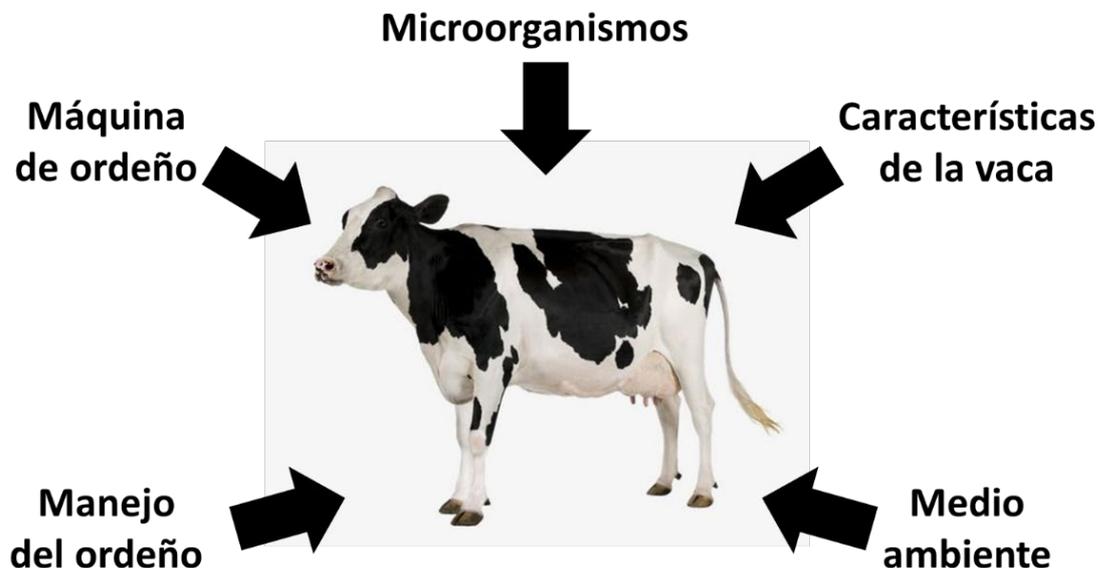


Figura 1: Principales factores que contribuyen o predisponen a la mamitis bovina. Adaptado de Poutrel (1985).

La inflamación de la glándula mamaria siempre produce cambios significativos en la composición bioquímica de la leche; cuanto mayor sea la gravedad de la inflamación, más se parecerá la composición de la secreción láctea a la del suero sanguíneo (IDF, 1987a). Esta circunstancia influye directamente sobre los costes de producción, provocando importantes pérdidas económicas al ganadero asociadas a los costes directos, debidos al incremento del gasto en medicamentos y veterinario, y a los costes indirectos, asociados a la disminución de la producción de leche, a penalizaciones económicas por el recuento elevado de células somáticas o por incumplimiento de los estándares de calidad bioquímica de la leche y al acortamiento de la vida productiva de los animales, bien por sacrificio o muerte. En conjunto, se ha descrito que la mamitis representa el 38 % del total de las pérdidas de producción producidas por enfermedades (Kossaibati y Esslemont, 1997), siendo la enfermedad económicamente más relevante en las explotaciones de bovino de leche.

Aunque la mamitis nunca puede ser erradicada, el trabajo constante del ganadero, del veterinario, de la industria láctea y de la administración, implantando planes y normativas de calidad de la leche, permite avanzar en el objetivo de reducir la incidencia y el impacto de esta infección en las granjas bovinas.

En contraposición a la definición de esta patología de la ubre, la FIL define la ubre normal como aquella que no muestra alteraciones patológicas y cuya leche presenta propiedades organolépticas normales, no se aíslan microorganismos patógenos, ni presenta un recuento de células somáticas elevado (IDF, 1987a). Todas estas características tienen que estar presentes en una ubre sana y en la leche que esta produce, al contrario de lo que ocurría en la definición de la ubre enferma o con mamitis que es aquella que presenta signos de inflamación o en la que se detectan microorganismos patógenos en la leche o alteraciones bioquímicas en su composición.

Como recogen diferentes autores existen distintos criterios a utilizar en clasificación de las mamitis bovinas, siendo el más utilizado y de mayor utilidad práctica el que fundamentado en la intensidad de la inflamación (IDF, 1987a). Ahora bien, en función de si la aparición de alteraciones patológicas son localizadas o generalizadas (Giesecke, 1974), las mamitis bovinas se clasifican como mamitis clínicas o mamitis subclínicas:

- Mamitis clínica se define como aquel proceso caracterizado por alguna alteración macroscópica en la leche o por signos de inflamación en la ubre. Por lo tanto, este tipo de mamitis puede ser detectada mediante la simple exploración clínica suficientemente cuidadosa del animal y de la secreción láctea.
- Mamitis subclínica se define como aquel proceso que afecta a la ubre pero que no se asocia a la aparición de signos clínicos en la ubre, ni tampoco a cambios macroscópicos en la secreción láctea. En contraposición, en la mamitis subclínica existe únicamente un aumento del recuento de células somáticas (RCS), acompañado o no de alteraciones en las propiedades bioquímicas de la leche. Estas mamitis subclínicas son detectables mediante pruebas de laboratorio o por pruebas de campo como el test de California (del inglés *California mastitis test* o CMT).

El término de células somáticas se refiere, de forma general, a todas las células del cuerpo a excepción de aquellas que corresponden a la línea germinal, que produce los

espermatozoides y los óvulos. Son las células que no aportan nada en términos de herencia y que, por tanto, son útiles para el propio organismo vivo, pero no influyen ni afectan a su descendencia. En el caso de la leche, las células somáticas incluyen las células de los mecanismos de defensa natural del animal como los linfocitos, macrófagos polimorfonucleares y neutrófilos (Pillai y col., 2001) y, en menor proporción, células de descamación de la propia estructura glandular (Sordillo y col., 1997). Constituyen, por tanto, un reflejo de la respuesta inflamatoria provocada por un agente externo que ha penetrado en la mama y que está actuando a este nivel (Figura 2).

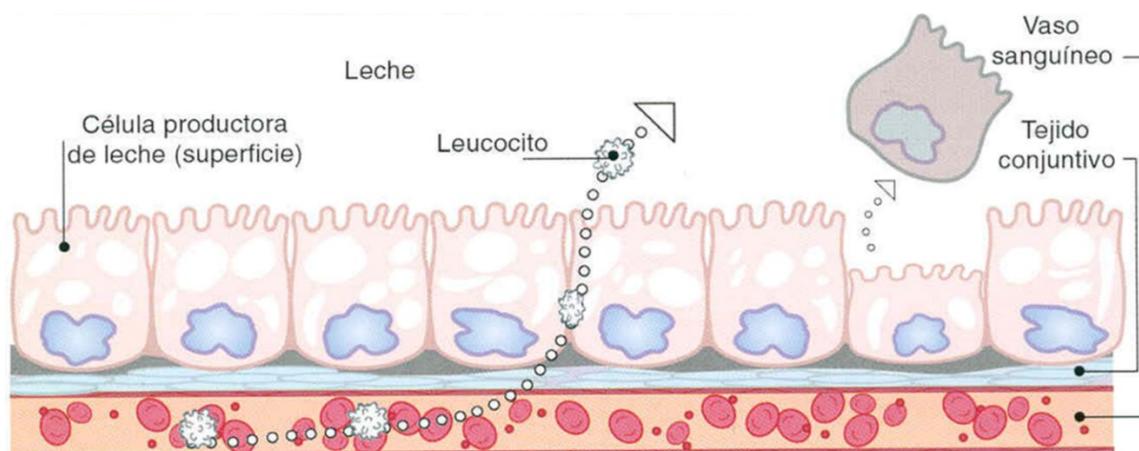


Figura 2: Origen de las células somáticas en leche a partir de la descamación de células del epitelio de los alveolos y conductos y del paso de células inflamatorias a partir de la sangre.

Adaptado de Sordillo y col (1997).

Por esta razón la FIL ha establecido el RCS como el mejor indicador de la respuesta inflamatoria de la glándula mamaria (IDF, 1987a). Diversos autores han establecido que el RCS de cuarterones individuales en animales sanos es de, aproximadamente, 70.000 células (cls)/ml, siendo este valor dependiente de la edad del animal, de su producción o de la fase de la lactación. De forma paralela, se ha propuesto que valores de RCS en cuarterones de 200.000-250.000 cls/ml son claramente indicativos de infección y proceso inflamatorio. En base a estos valores, se ha determinado una sensibilidad y especificidad de aproximadamente un 75 % y 90 %, respectivamente, para el RCS en el diagnóstico de mamitis bovina (Schepers y col., 1997).

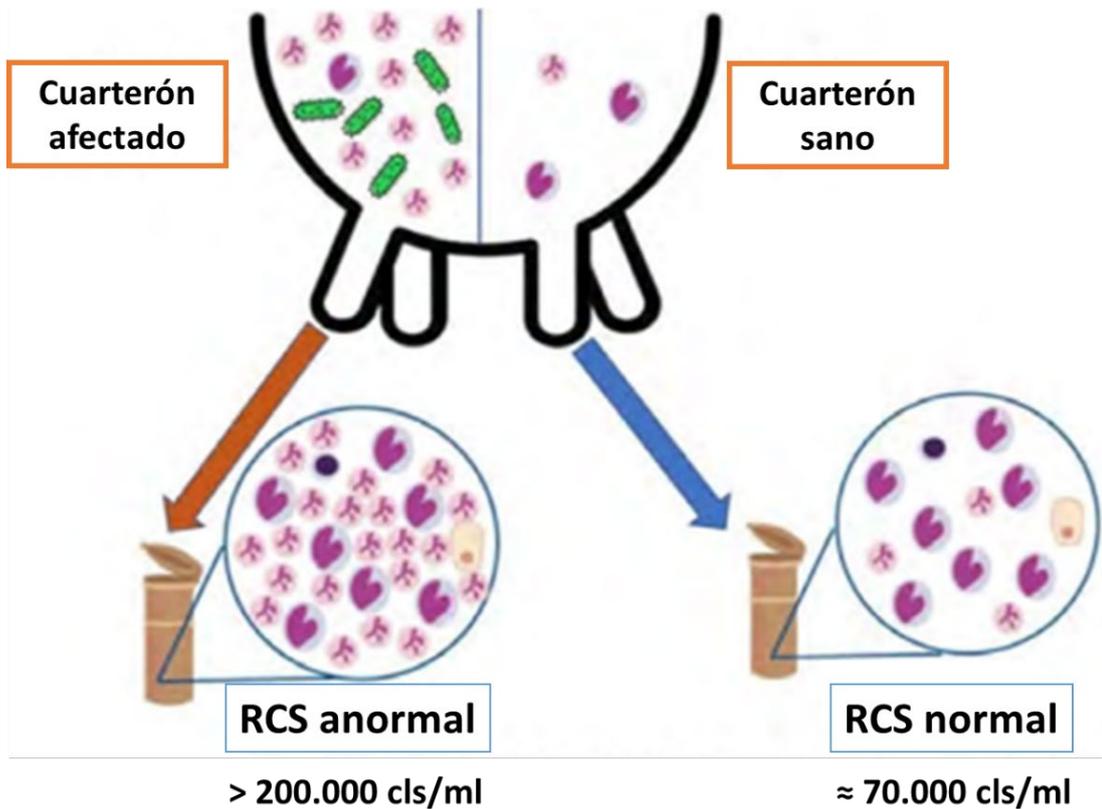


Figura 3: Recuento de células somáticas (RCS) en el diagnóstico de mastitis subclínicas. Adaptado de Bach y McArt (2018).

Centrándonos en las mastitis clínicas, objeto de estudio en el presente trabajo, se han propuesto diferentes clasificaciones.

Atendiendo a su forma de presentación y patogenia (Faull y Hughes, 1983; IDF, 1978a), se pueden identificar las siguientes categorías:

- *Mamitis sobreaguda o hiperaguda*: mastitis de curso rápido, con desarrollo de signos clínicos en pocas horas. Existen signos evidentes de inflamación del cuarterón afectado y alteraciones importantes en la secreción láctea en el ordeño. Además, el animal presenta signos generales como fiebre, anorexia, apatía, etc.
- *Mamitis aguda*: con un desarrollo más lento, al menos de 24 horas. El cuarterón presenta signos de inflamación y la secreción láctea está alterada macroscópicamente, pero el animal no presenta signos generales.

- Mamitis subaguda: la evolución de la mamitis conlleva, por lo menos, varios días. No existen alteraciones en el cuarterón afectado, ni signos generales en el animal. Sin embargo, se observan cambios visibles en la secreción láctea, sobre todo al inicio del ordeño.

- Mamitis crónica: mamitis de curso mucho más lento, llegando a prolongarse semanas o meses. No se observan signos de inflamación local, pero si signos como induración, atrofia o disfunción del cuarterón. Este tipo de mamitis se caracteriza por una sustitución progresiva del tejido glandular por tejido conectivo. El animal no presenta signos generales, pero en la secreción láctea pueden observarse alteraciones, particularmente en los primeros chorros.

Algunos autores consideran que las mamitis subclínicas constituyen la causa principal de pérdidas económicas en los rebaños lecheros, puesto que su existencia impide que se alcance el potencial de producción de los animales; al mismo tiempo que disminuye la cantidad y calidad de la leche, obligan a hacer frente a las penalizaciones en el pago de calidad marcadas por la industria láctea (Huijps y col., 2008). El cálculo de las pérdidas económicas asociadas a las mamitis subclínicas es más complejo que el de las clínicas. En este sentido, Philpott (1984) demostró que existía una relación entre el RCS y la producción de leche por el animal, de manera que RCS superior a 200.000 cls/ml es inversamente proporcional a la producción de leche, calculando que existía una disminución de un 2,5 % de producción por cada aumento en 100.000 cls/ml. Adicionalmente, tanto las mamitis clínicas como subclínicas tienen un claro efecto adverso sobre la fertilidad del rebaño lechero (Schrick y col., 2001).

2.1.2- Etiología de las mastitis bovinas y clasificación de los patógenos mamarios

Tal y como hemos señalado anteriormente, los factores bióticos son, sin lugar a dudas, la principal causa en la etiología de la reacción inflamatoria de la glándula mamaria, existiendo más de 130 especies diferentes de microorganismos que se han asociado a mamitis bovina (Watts, 1988). Sin embargo y a pesar de esta amplia variedad, la gran mayoría de las infecciones intramamarias son causadas por un número reducido de patógenos.

De los diferentes Marco y diversos estudios realizados sobre los patógenos que participan en las infecciones intramamarias cabe reseñar que los grupos etiológicos aislados con mayor frecuencia en las mamitis bovinas incluyen estafilococos, estreptococos, corinebacterias y coliformes (Marco y col., 1998; Makovec y Ruegg, 2003; Pitkälä y col., 2004; Bradley y col., 2007; Ferguson y col., 2007; Piepers y col., 2007; Sampimon y col., 2009b; Nam y col., 2010; Kalmus y col., 2011), detectándose con menor frecuencia y con marcadas diferencias entre los estudios otros patógenos como *Bacillus* spp., *Nocardia* spp., *Lactotoccus* spp., *Prototheca* spp., *Pseudomonas* spp., *Trueperella pyogenes*, enterococos, micoplasmas, levaduras y hongos.

Desde el punto de vista del impacto sobre la salud del animal y los valores del RCS así como sobre la calidad de la leche y la producción los patógenos mamarios pueden clasificarse como patógenos principales o “mayores” y patógenos “menores”. La mayoría de los autores consideran patógenos mamarios principales a *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*), *Streptococcus dysgalactiae* (*S. dysgalactiae*), *Streptococcus uberis* (*S. uberis*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y *Escherichia coli* (*E. coli*) (Zadoks y Fitzpatrick, 2009), entendiendo que en este grupo se engloban aquellos patógenos que tienen un considerable impacto sobre la salud de la vaca (asociado a mamitis clínicas o a mamitis subclínicas con altos RCS), la calidad de la leche y la producción. Aunque esta clasificación no permite clasificar con claridad a muchos otros microorganismos bajo este mismo criterio puesto que existe poca información dada su baja frecuencia de aislamiento, sí que es relevante por permitir establecer las prioridades en relación a la adopción de medidas de control y prevención.

Los dos principales aspectos que se tienen en cuenta en esta clasificación de patógenos mamarios como mayores y menores incluyen su mayor o menor frecuencia de

aislamiento en casos de mastitis clínica y su impacto sobre los RCS en el caso de las mastitis subclínicas.

Así los RCS, considerando la media geométrica, por cuarterón afectado estimados en base a un metaanálisis (Djabri y col., 2002) en las infecciones intramamarias por *S. aureus* (357.000 cls/ml) fueron superiores a los observados en el caso de los estafilococos coagulasa negativos (138.000 cls/ml) y *Corynebacterium* spp. (105.000 cls/ml), pero mucho más bajos que los hallados en las infecciones causadas por *S. uberis* (1.024.000 cls/ml), *S. agalactiae* (857.000 cls/ml), *S. dysgalactiae* (547.000 cls/ml) y coliformes (1.151.000 cls/ml).

En cuanto a su frecuencia en relación con casos de mastitis clínica, Kalmus y col. (2011) en un estudio con más de 8.000 muestras remitidas al laboratorio para su diagnóstico comprobaron que algunas especies como *S. aureus*, estafilococos coagulasa negativos y *Corynebacterium* spp. se aislaban en mayor porcentaje en casos de mastitis subclínicas. Por el contrario, otros microorganismos como *S. dysgalactiae*, *E. coli*, *Klebsiella* spp. o *Trueperella pyogenes* se aislaban con mayor frecuencia en el caso de muestras recogidas en individuos con mastitis clínicas.

Desde el punto de vista práctico es empleada de forma muy habitual una clasificación de estos agentes etiológicos de mastitis en base a la principal fuente de infección y el modo de transmisión tal y como se muestra en la Figura 4. Así, los microorganismos que causan las mastitis se clasifican como patógenos contagiosos o ambientales (Smith y Hogan, 1995).

Los patógenos contagiosos incluyen a *S. agalactiae*, *S. aureus*, *Corynebacterium* spp. y *Mycoplasma* spp. y tienen como principal reservorio las glándulas mamarias infectadas, produciéndose el contagio con mayor frecuencia durante el ordeño (Smith y Hogan, 1995). Además, existen fuentes de infección adicionales que permiten la transmisión a través de lesiones de los pezones infectados, especialmente si no se realiza de forma adecuada la desinfección de pezones posordeño (IDF, 1987). Se ha descrito que algunos de estos microorganismos se caracterizan por su capacidad para colonizar y multiplicarse en la piel y en el canal del pezón (Smith y Hogan, 1995).

Por su parte, los patógenos ambientales, entre los que cabe destacar a los coliformes y a *S. uberis*, tienen como fuente principal de infección el ambiente en el que

viven las vacas y en esos casos la infección se produce generalmente en el periodo entre ordeños, a través del contacto con material contaminado, principalmente la cama. Estas mamitis se asocian, por tanto, a una mala higiene ambiental o a un deficiente manejo (Dodd y Neave, 1970; Smith y Hogan, 1995).

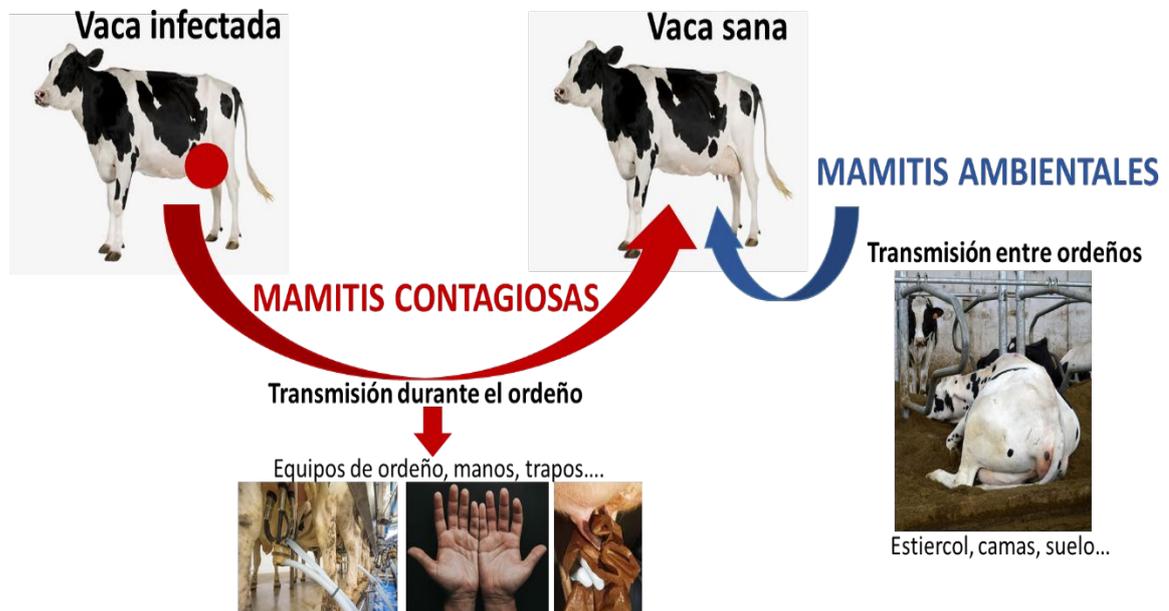


Figura 4: Fuentes de infección y mecanismos de transmisión en las mamitis contagiosas y ambientales.

Las bacterias Gram negativas presentan, por lo general, mayor dificultad para sobrevivir y multiplicarse en el epitelio del canal del pezón y, por esta razón, la concentración de estas bacterias en el pezón está determinada por la exposición continua de la vaca al medio contaminado, fundamentalmente material de la cama con estiércol, agua y suelo. El constante contacto del extremo de los pezones con el material de las camas es una de las fuentes de infección más importantes para los patógenos ambientales (Hogan y col., 1989). Diferentes estudios han puesto de manifiesto la existencia de una correlación positiva entre el nivel de contaminación por bacterias Gram negativas en las camas y el del extremo apical del pezón. En consecuencia a todo ello, las tasas de mamitis clínicas causadas por este grupo de bacterias están directamente relacionadas con determinados materiales que se utilizan como cama (Hogan y Smith, 2003) y que pueden sustentar poblaciones de coliformes superiores a un millón de colonias por gramo (Hogan y col., 1989).

Los estudios sobre las infecciones intramamarias causadas por patógenos ambientales han puesto de manifiesto que una importante proporción de estas infecciones se originan durante el período de secado (Smith y Hogan, 1995). Además, la tasa de infección varía a lo largo de este periodo y también en función del microorganismo. Así, la tasa de infección por patógenos ambientales es más alta durante las dos semanas inmediatamente posteriores al secado y en las dos semanas inmediatamente anteriores al parto (Smith y Hogan, 1995). En el caso concreto de las infecciones por *E. coli* son poco frecuentes durante los períodos inicial y medio del secado, ocurriendo la gran mayoría de las infecciones entre los 7 y los 10 días previos al parto, aunque las manifestaciones clínicas aparecen generalmente más tarde, en los primeros días de la lactación (Smith y Hogan, 1995). Otros estudios señalan que las infecciones por otros microorganismos Gram negativos diferentes de *E. coli* se distribuyen de manera más uniforme entre la fase inicial y la fase final del período seco (Smith y Hogan, 1995).

La introducción en las últimas décadas de las técnicas de biología molecular ha permitido poner de manifiesto diferencias en el comportamiento epidemiológico, fuentes de infección, modo de transmisión y características patológicas entre distintos patógenos mamarios y también entre cepas de una misma especie (Zadoks y col., 2003; Haveri y col., 2008). Estos estudios han determinado que la clasificación tradicional en patógenos ambientales y contagiosos no puede ser aplicada de una forma rigurosa en el caso de algunos de los microorganismos que producen mamitis bovina (Bradley, 2001). Así, cada vez se describen más casos de microorganismos con un comportamiento mixto. En cualquier caso y desde un punto de vista práctico, esta clasificación continúa siendo a día de hoy la más utilizada entre los veterinarios especializados en calidad de la leche.

2.1.3- Principales patógenos mamarios Gram negativos: epidemiología y patogenicidad

2.1.3.1- *Escherichia coli*

E. coli es una enterobacteria que forma parte de la microbiota del tracto gastrointestinal de animales homeotermos, incluidos todos los rumiantes, siendo esencial para el correcto funcionamiento del proceso digestivo. Se trata de una bacteria de morfología bacilar de pequeño tamaño o cocobacilar, Gram negativa, oxidasa negativa, catalasa positiva y anaerobia facultativa, cuya temperatura de crecimiento preferente es de 37°C, provista de fimbrias y generalmente móvil gracias a la presencia de flagelos peritricos (Crichton y Old, 1979).

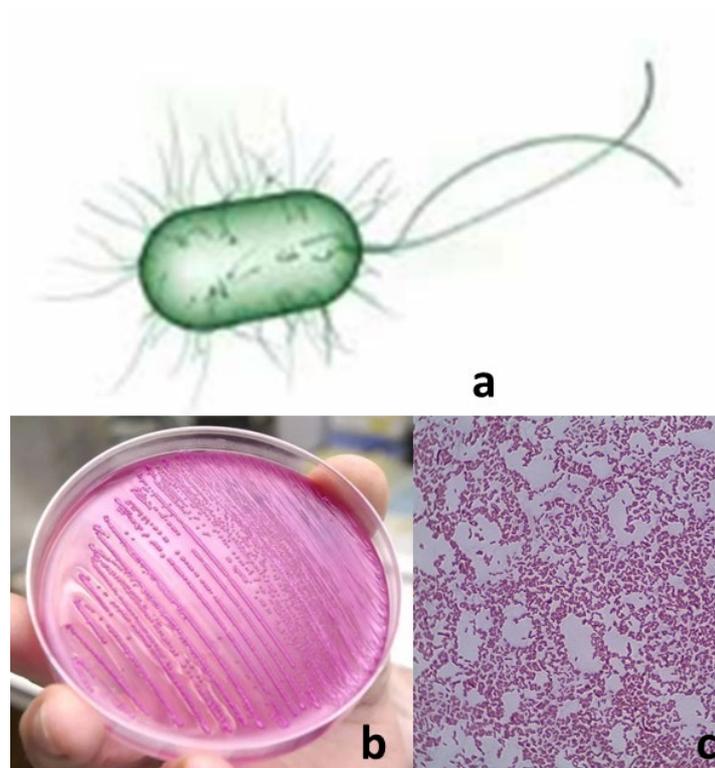


Figura 5: Principales características de los aislados de *Escherichia coli*: Gram negativo (C) de morfología colibacilar (A y C) y provisto de flagelos peritricos (A). Genera colonias de color rosa (fermenta la lactosa) en medios como el agar McConkey (B).

Se trata de un patógeno mamario principal, estando implicado en una elevada proporción de los casos de mamitis bovina y causando, habitualmente, una infección que se acompaña de signos clínicos o, lo que es lo mismo, una mamitis clínica (Zadoks y Fitzpatrick, 2009). Las características clínicas y la evolución de las mamitis por *E. coli* varían según la cepa implicada, pudiendo originar desde mamitis leves, caracterizadas por signos clínicos locales en la ubre y con una duración corta, hasta presentaciones muy severas o incluso fatales (Burvenich y col., 2003).

Las infecciones mamarias por *E. coli* tienen en común que la mamitis clínica cursa con una aparición repentina, desarrollándose en muchos casos de un ordeño al siguiente, y acompañándose de cambios en la apariencia de la leche que inicialmente tiene un aspecto seroso y amarillento para, posteriormente, presentar coágulos y mayor espesor (Hogan y col. 1989).

A pesar de que *E. coli* es el patógeno más frecuentemente aislado en mamitis sobreagudas (60-70 % de los casos), apenas un 10 % del total de las infecciones por esta bacteria se asocian a la aparición de signos generales siendo exagerada la asociación de esta bacteria con las mamitis sobreagudas (Hogan y col, 1989). Ahora bien, cuando se producen estas presentaciones sobreagudas en las mamitis por *E. coli* cabe destacar que el RCS presenta un notable aumento y que, además, la ubre está dura e inflamada y la vaca muestra signos sistémicos graves, que generalmente cursan con aumento de la temperatura corporal y de la frecuencia cardíaca, reducción del ritmo de las contracciones ruminales, pérdida del apetito, depresión y reducción drástica de la producción de leche.

En los desafíos experimentales los primeros signos clínicos observados son los signos locales, aproximadamente a las 8 horas de la exposición, alcanzando la fiebre y los signos clínicos sistémicos el máximo a las 12 horas (Hirvonen y col., 1999). Diversos autores han descrito que, en un curso de infección leve o moderada, los signos sistémicos desaparecen en 48 horas mientras que los signos clínicos locales en 7 días (Hirvonen y col., 1999); en los casos graves, las vacas pueden morir o sufrir signos generales, incluida la pérdida de la producción láctea, que se prolongan en el tiempo (Hirvonen y col., 1999).

En granja, las infecciones por este patógeno suelen ser de corta duración, con una media inferior a 10 días, haciéndose evidentes en el curso de la lactación y siendo relativamente raro que se cronifiquen y se prolonguen por periodos de más de 90 días (Todhunter y col., 1991b). Sin embargo, en algunos rebaños también se ha documentado

un porcentaje importante de infecciones crónicas asociadas a *E. coli* (Hogan y col., 1989). La elevada incidencia de esta infección unida a una duración generalmente corta hace que el RCS en tanque no sea un indicador muy adecuado para estimar la prevalencia de esta infección en el rebaño (Hogan y col., 1989).

Además, como hemos comentado anteriormente, diferentes estudios demuestran la existencia de importantes variaciones en la duración de la infección experimental en función de las cepas y las dosis utilizadas en el desafío. Así, se han descrito casos de mastitis clínica por *E. coli* recurrentes y con considerables pérdidas económicas para el ganadero (Lamy col., 1996; Bar y col., 2007). Estos animales con episodios clínicos repetidos suelen presentar signos leves, pero provocan un uso continuado de medicamentos que repercute en los costes de explotación (Wenz y col., 2006).

La patogenia de esta infección está relacionada con la liberación de endotoxinas, hecho característico de las infecciones por bacterias Gram negativas. En desafíos experimentales se han detectado *E. coli* y sus endotoxinas en leche hasta 5-7 días después de la inoculación (Pyörälä y col., 1994), aunque la bacteriemia o la endotoxemia suceden excepcionalmente y solo en los casos más graves (Wenz y col., 1999, 2001). Los estudios sobre los niveles de endotoxinas que se alcanzan en sangre de vacas con mastitis tras infecciones experimentales por *E. coli* demuestran que los signos sistémicos están relacionados con la liberación de mediadores de la inflamación, provocados, a su vez, por los elevados niveles de endotoxina. Así pues, la endotoxina promueve niveles deletéreos de los mediadores de la inflamación (Burvenich y col., 2003). Teniendo en cuenta que no se han detectado otros factores de virulencia específicos que diferencien o caractericen la capacidad de las cepas de *E. coli* para causar mastitis se puede concluir que la gravedad de la infección, desde leve a fatal, es consecuencia de las características intrínsecas del hospedador y de su respuesta inflamatoria (Burvenich y col., 2003).

En las vacas de alta producción la mayoría de las infecciones por *E. coli* se manifiestan clínicamente al inicio de lactación, estando relacionadas con la existencia de una inmunodepresión por deficiencias metabólicas (Suriyasathaporn y col., 2000a; Burvenich y col., 2003). También se detectan en animales con RCS extremadamente altos (Suriyasathaporn y col., 2000b; Peeler y col., 2003). Las vacas en el periparto o al inicio de la lactación presentan signos más marcados y es en este periodo en el que se producen generalmente las bajas asociadas a mastitis por *E. coli* (Hill y col., 1979). Como se ha

comentado anteriormente, en muchas ocasiones estas mamitis clínicas por *E. coli* observadas durante la lactación son, en realidad, el resultado de infecciones acontecidas durante el periodo seco (Bradley y Green, 2000), hecho que nos permite señalar este periodo como la etapa más crítica en el control de las mamitis por *E. coli* en el ganado bovino.

Como hemos mencionado al inicio de este apartado, *E. coli* es un habitante habitual del tracto gastrointestinal de los mamíferos, por lo que dada su ubicuidad se puede afirmar que es un claro candidato a ser considerado como principal patógeno ambiental en las mamitis bovinas. No existen evidencias claras de su transmisión de vaca a vaca (Zadoks y Fitzpatrick, 2009), estando esta afirmación basada en datos epidemiológicos y en estudios de tipificación de cepas que han puesto de manifiesto la gran heterogeneidad existente entre los aislados presentes en las granjas (Nemeth y col., 1994; Lamy y col., 1996). Además, no se han encontrado diferencias significativas entre las cepas de *E. coli* aisladas de heces y de leche, siendo este hecho el que permite considerar que las heces son la principal fuente de infección (Nemeth y col., 1994).

Ahora bien, debemos señalar que existen estudios que ponen de manifiesto la posibilidad de que en algún caso pueda tener lugar la transmisión entre cuarterones infectados. Así, se ha demostrado que entre el 8,5 % y el 28 % de las cepas aisladas de cuarterones infectados son las mismas que se implican en la posterior infección de otro cuarterón de un mismo animal (Döpfer y col., 1999; Bradley y Green, 2001).

Finalmente, podemos mencionar que existen estudios que describen variaciones estacionales de las tasas de nuevas infecciones y de los casos clínicos de mamitis por coliformes, siendo mayores en los meses de verano y también en las vacas estabuladas (Todhunter y col., 1991b). El aumento de la incidencia de mamitis clínicas coincide con el aumento del recuento de bacterias Gram negativas en la cama durante los meses de más calor. Además, se ha propuesto que el estrés por calor podría ser un factor de riesgo en la mamitis por coliformes (Hogan y Smith, 2003). Otros estudios han demostrado que otro factor predisponente de infección puede ser la edad del animal o el diseño de las instalaciones. Así, por lo general las vacas más viejas tienen una mayor incidencia de mamitis clínicas causadas por bacterias Gram negativas en comparación con las primíparas, siendo máximo el riesgo en las hembras más viejas que paren en los meses de verano (Smith y Hogan, 1985). Por otro lado, un inadecuado diseño del establo o

incluso un mal manejo del rebaño del vacuno de leche pueden también ser factores predisponentes para las mamitis por coliformes (Ward y col., 2002). Existen estudios que asocian las mamitis colibacilares más graves con problemas reproductivos tales como ciclos estrales anormales, niveles séricos bajos de progesterona y abortos (Cullor, 1991).

2.1.3.2- *Klebsiella* spp.

Otras bacterias Gram negativas a tener en cuenta como agentes etiológicos de mamitis son las bacterias del género *Klebsiella*, siendo *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) la especie más común en los aislamientos de mamitis bovinas y, en menor medida, *Klebsiella oxytoca*. Se trata de un género de bacterias inmóviles, Gram-negativas, anaerobias facultativas y con una prominente cápsula de polisacáridos, que reciben su nombre en honor al microbiólogo alemán Edwin Klebs. Son fijadoras de nitrógeno y ubicuas en la naturaleza (Podschun y Ullmann, 1998).

K. pneumoniae es, después de *E. coli*, el coliforme más frecuentemente aislado en muestras de infecciones intramamarias y mamitis clínicas de bovinos (Hogan y Smith, 2003). De hecho, las mamitis por *Klebsiella* spp. se consideran, junto a las producidas por micoplasmas, las más importantes desde el punto de vista clínico en EEUU (Hoe y Ruegg, 2005; Munoz y col., 2007; Paulin-Curlee y col., 2007).

Estas infecciones de la glándula mamaria por *Klebsiella*, de igual forma que las causadas por *E. coli*, son consideradas como principales o “mayores” por su curso clínico agudo. Las vacas con mamitis asociadas a bacterias del género *Klebsiella* tienen más probabilidad o riesgo de morir o ser sacrificadas que las afectadas por otros tipos de mamitis (Erskine y col., 2002) y, de hecho, se considera que tienden a provocar mamitis incluso más graves que las asociadas a *E. coli* (Erskine y col., 2002), caracterizándose además por una escasa respuesta a la antibioterapia (Roberson y col., 2004).

La duración media de la infección mamaria por *K. pneumoniae* es de 21 días (Smith y col, 1985), superior a la de las infecciones por *E. coli* (Todhunter y col, 1991b). Además, las infecciones crónicas causadas por este Gram negativo pueden superar los 90 días de duración, aunque al igual que sucede con las causadas por *E. coli*, son relativamente poco frecuentes.

A diferencia de lo que ocurre en el caso de *E. coli* no existen prácticamente estudios sobre la heterogeneidad de las cepas de *Klebsiella* que se implican en la infección mamaria ni se dispone de información sobre su relación con los aislados presentes en el ambiente de las explotaciones bovinas que permitan esclarecer las rutas de transmisión (Zadoks y col., 2011). Sin embargo, son considerados patógenos ambientales y se considera que la eliminación fecal contribuye en gran medida a la exposición y a la incidencia de mamitis por estas bacterias en rebaños lecheros (Munoz y col. 2006, 2007). En este sentido, se han descrito brotes de mamitis por *Klebsiella* spp. en rebaños que se han asociado con la exposición a camas de serrín contaminadas (Vecht y col., 1987; Sampimon y col., 2006).

Los estudios con aislamientos ambientales han proporcionado resultados contradictorios. Así, contrariamente a lo que ocurre con *E. coli*, se describen con frecuencia cepas diversas de *Klebsiella* tanto entre diferentes tipos de muestras, heces, rumen, agua de bebida o ambiente de la granja, como dentro del mismo tipo de muestras, haciendo muy complejo el determinar el origen de las cepas implicadas en los cuadros de mamitis (Munoz y col., 2007). Parece ser que las camas a base de material de madera, serrín y virutas, intervienen frecuentemente como fuente de *Klebsiella* spp. y están vinculadas con brotes de mamitis por este microorganismo (Newman y Kowalski, 1973; Sampimon y col., 2006). Sin embargo, este no es el único material con el que se asocian brotes puesto que este género también se ha aislado de colchones sin virutas y de otros materiales empleados como cama (Kristula y col., 2008). Como hemos apuntado anteriormente, existe una gran heterogeneidad entre las cepas aisladas en las vacas de un mismo rebaño (Paulin-Curlee y col., 2007), aunque también se han detectado cepas que afectan a varias vacas de una misma explotación (Munoz y col., 2007). Esta circunstancia se atribuye, principalmente, a la excreción en la leche de las vacas infectadas, antes o después del ordeño, que da lugar a una contaminación de la cama con un gran número de colonias de una determinada cepa, más que a una posible transmisión directa durante el proceso del ordeño, aunque ésta no pueda ser descartada por completo (Munoz y col., 2007).

Dado que no se ha detectado la presencia de *Klebsiella* spp. en diversos materiales antes de su utilización como cama, son varios los estudios que han propuesto que su presencia es consecuencia de la contaminación a partir de las heces o de la leche de los animales infectados (Munoz y col., 2007). En este sentido es importante tener en cuenta

que *Klebsiella* spp. se encuentra en el suelo, alimento, agua y tracto intestinal de los animales y que su eliminación fecal no parece estar asociada con un estado de portador crónico, sino más bien, con una ingesta frecuente de bacterias de este género que pasan a través del tracto gastrointestinal (Munoz y Zadoks, 2007).

Existen pocos estudios que hayan investigado la existencia de algún patrón de distribución estacional en las infecciones intramamarias debidas a este patógeno ya que en la mayoría de los estudios se incluyen de forma general dentro del grupo de las mamitis de etiología coliforme. Aun así, parece ser que existe una mayor prevalencia de estas infecciones durante los meses de verano, al menos en los EEUU (Estados Unidos, del inglés *United States*) (Makovec y Ruegg, 2003).

2.1.3.3- Otros microorganismos Gram negativos

Además de los patógenos anteriormente descritos existen otros muchos microorganismos Gram negativos que, con menor frecuencia, se ven involucrados en infecciones intramamaria y que han sido aislados en muestras de leche de vacas con mamitis, tales como *Serratia* spp., particularmente *Serratia marcescens* y *Enterobacter* spp. como *Enterobacter cloacae* (Schukken y col., 2011). Por su menor frecuencia de aparición, todos estos microorganismos son considerados como patógenos “menores” desde el punto de vista de la patología de la glándula mamaria.

Serratia es un género de bacterias Gram negativas, anaerobias facultativas y baciliformes de la familia *Yersiniaceae*, siendo *Serratia marcescens* (*S. marcescens*) la especie más común del género que se implica, comúnmente, en infecciones nosocomiales. Las infecciones mamarias por *Serratia* spp. no suelen asociarse a signos clínicos, siendo claramente menos graves que las mamitis asociadas a *E. coli* (Todhunter y col., 1991b; Hogan y Smith, 1997). La especie de *Serratia* más frecuentemente aislada en procesos infecciosos intramamarios es *S. marcescens*, seguida por *Serratia liquefaciens* (Todhunter y col., 1991a). Aunque son patógenos ambientales, se han descrito brotes por *Serratia* asociados al indebido uso de un desinfectante de pezones mediante inmersión que había sido contaminado en la propia granja (van Damme, 1982).

Las bacterias de este género tienden a producir infecciones más crónicas que *E. coli*, con una duración media superior a los 160 días, habiéndose descrito casos con persistencia durante varias lactaciones (Hogan y col., 1989). Al igual que en el caso de *E.*

coli, se ha descrito que pueden alternarse episodios clínicos y subclínicos (Bowman y col., 1986; Di Guardo y col., 1997).

Se han identificado como fuentes potenciales de *Serratia* spp. el suelo, plantas, alimentos, agua, la cama y el ambiente de la sala de ordeño (Kamarudin y col., 1996). Aunque no se ha demostrado que las bacterias coliformes adquieran resistencia a los desinfectantes comúnmente empleados en la higiene del ordeño, sí que se han descrito estas resistencias en el caso de bacterias del género *Serratia* que no suelen ser susceptibles a la actividad antibacteriana de la clorhexidina (Lannigan y Lawrence, 1989). En este sentido, se han asociado brotes de *S. marcescens* con el uso de desinfectantes con clorhexidina contaminados en la propia granja (Muellner y col., 2011).

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) es otra bacteria Gram negativa que puede estar implicada en infecciones intramamarias. Esta especie bacteriana se incluye en el género *Pseudomonas* que incluye bacilos rectos o ligeramente curvados, no formadores de esporas, oxidasa positivos y aeróbicos estrictos que realizan el catabolismo de los glúcidos por la ruta de Etnier-Doudoroff y el ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Entre las especies de este género es común la presencia de plásmidos. Son organismos ubicuos que se aíslan tanto de suelos limpios como de suelos altamente contaminados, siendo microbiota predominante en la rizosfera y la filosfera de plantas, así como de ambientes acuáticos, tanto de agua dulce como de aguas marinas (Cornelis, 2008).

Las infecciones mamarias por *P. aeruginosa* cursan, generalmente, de forma crónica, pudiendo incluso persistir varias lactaciones. Ocasionalmente pueden dar lugar a cuadros agudos o subagudos o generar infecciones subclínicas (Hogan y col., 1989). Se considera que *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista, que vive de manera saprófita en suelo y agua, por lo que generalmente las infecciones provienen del agua y baños de pezones o de tratamientos contaminados (normalmente mezclas de varios medicamentos realizada en la propia explotación) o administrados con poca higiene (Bannerman y col., 2005). Una de las principales características de este patógeno es la producción de biofilm, hecho que le proporciona una amplia resistencia a antibióticos (Bannerman y col., 2005) e incluso a algunos desinfectantes de uso habitual como la clorhexidina (Lannigan y Lawrence, 1989).

Ocasionalmente se aíslan otras especies de bacterias Gram negativas en muestras de leche de animales con infección intramamaria, como *Pasteurella* spp., *Enterobacter*

spp, spp. o *Raoultella* spp. (Watts, 1988; Wilson y col., 1997). Cabe mencionar que *Enterobacter cloacae* se ha descrito como agente etiológico de mamitis menos graves en comparación con otros coliformes (Schukken y col., 2011).

De entre todas estas especies podemos destacar a *Enterobacter aerogenes* (*E. aerogenes*), una bacteria Gram negativa, oxidasa negativa, catalasa positiva, citrato positiva e indol negativa, con forma de bastón y con capacidad para desplazarse gracias a la presencia de flagelos peritricos (Figura 6). Se trata de un agente infeccioso productor de mamitis bien reconocido por su capacidad para adquirir resistencia a los antibióticos utilizados contra infecciones por enterobacterias, gracias a mecanismos que inducen la activación o inactivación de genes cromosómicos o a través de la adquisición horizontal de nuevos genes de resistencia, generalmente asociada con el uso de antibióticos (Jacobson y col.1995; Pfaller y col., 1997; Lee y col., 2002; Barnaud y col., 2004). Se ha descrito que las cepas de *E. aerogenes* previamente susceptibles pueden adquirir o desarrollar fenotipos resistentes en periodos de tiempo inferiores a una semana (Bornet y col., 2000).

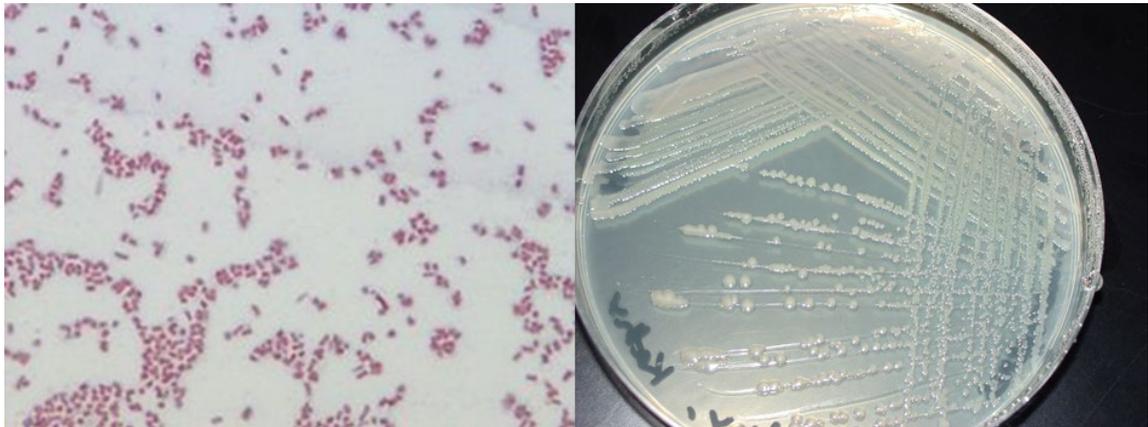


Figura 6: Morfología y características tintoriales (tinción de Gram) y crecimiento en agar triptona-soja de un aislado de *Enterobacter aerogenes*.

2.2- ENDOTOXINAS BACTERIANAS

2.2.1-. Biología de las endotoxinas bacterianas

Hace más de un siglo Richard Pfeiffer, durante la realización de un estudio sobre el cólera, descubrió que *Vibrio cholerae*, el agente etiológico del cólera, además de la exotoxina termolábil responsable del cuadro clínico de esta enfermedad, producía otra toxina (Pfeiffer, 1892). En contraste con las exotoxinas secretadas, esta nueva toxina poseía un carácter termoestable y formaba parte de la célula bacteriana, por lo que fue denominada endotoxina. Hoy en día, tras un número muy significativo de estudios, sabemos que la endotoxina es el LPS, el principal componente de la membrana externa de las bacterias Gram negativas que, si bien no es dañino cuando se localiza incrustado en la membrana celular de las bacterias, una vez liberado es altamente inmunoestimulante y, en gran medida, responsable de los signos clínicos de numerosas infecciones bacterianas (Nankar y Pande, 2013). Las endotoxinas desempeñan, por tanto, un papel clave durante la infección por bacterias Gram negativas, en la sepsis y shock séptico que se observan en los casos más graves de infección (Rietschel y Brade, 1992).

Las endotoxinas se liberan en cantidades mínimas cuando las bacterias crecen, pero sufren un incremento considerable y perjudicial para el huésped a medida que las bacterias se desintegran o mueren por diversas razones. Además, las endotoxinas, a su vez, forman parte de las vesículas de la membrana externa (del inglés *outer-membrane vesicles* o OMV) que son excretadas por las bacterias Gram negativas durante su replicación. Estas vesículas tienen diferentes funciones, tales como la secreción de proteínas importantes en la colonización del huésped, la emisión de autolisinas en un entorno competitivo, la supervivencia bacteriana para inhibir a otros competidores o la adquisición de nutrientes (Kulp y Kuehn, 2010).

2.2.2- Estructura y funcionalidad del LPS

Aunque existe una heterogeneidad en la composición de las endotoxinas derivadas de diferentes géneros, especies o, incluso, serotipos bacterianos, todos comparten una estructura y composición común, formando parte de la membrana externa de las bacterias Gram negativas (Figura 7).

Las endotoxinas son moléculas anfífilas formadas por un polisacárido hidrófilo y un lípido hidrofóbico denominado lípido A, unidos mediante un enlace covalente, tal y como se muestra en la Figura 8. El polisacárido, a su vez, se puede dividir en dos subdominios, el núcleo y la cadena O-específica, compuesta por una secuencia de unidades repetidas de polisacáridos idénticos (Lüderitz y col., 1982). Así, la cadena O-específica consta de hasta cincuenta unidades repetitivas, cada una compuesta por entre dos y ocho monómeros de azúcar (Lüderitz y col., 1982).

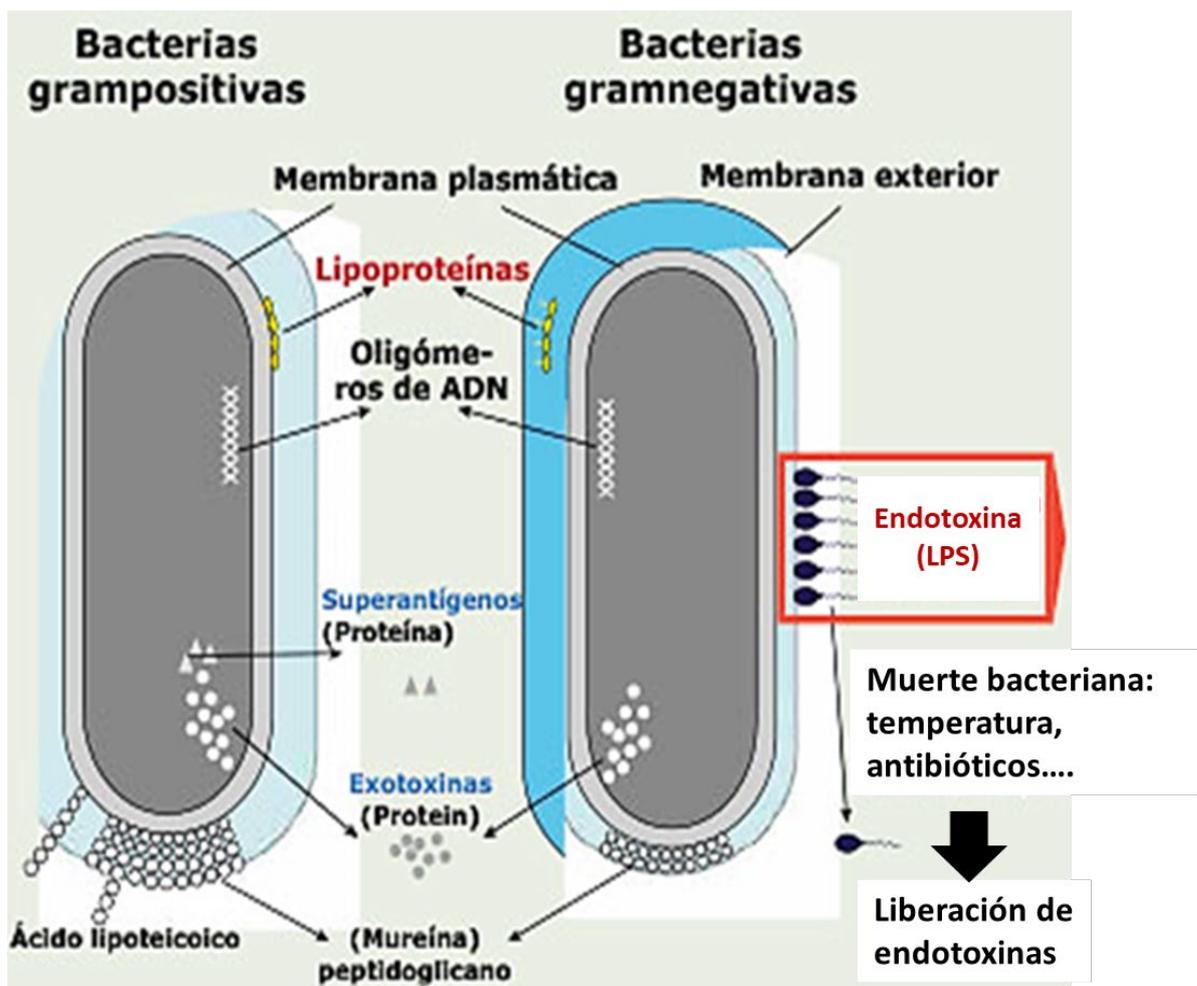


Figura 7: Diferencias en la estructura de la pared celular de las bacterias Gram positivas y Gram negativas. Adaptado de Schaumberger y col. (2016).

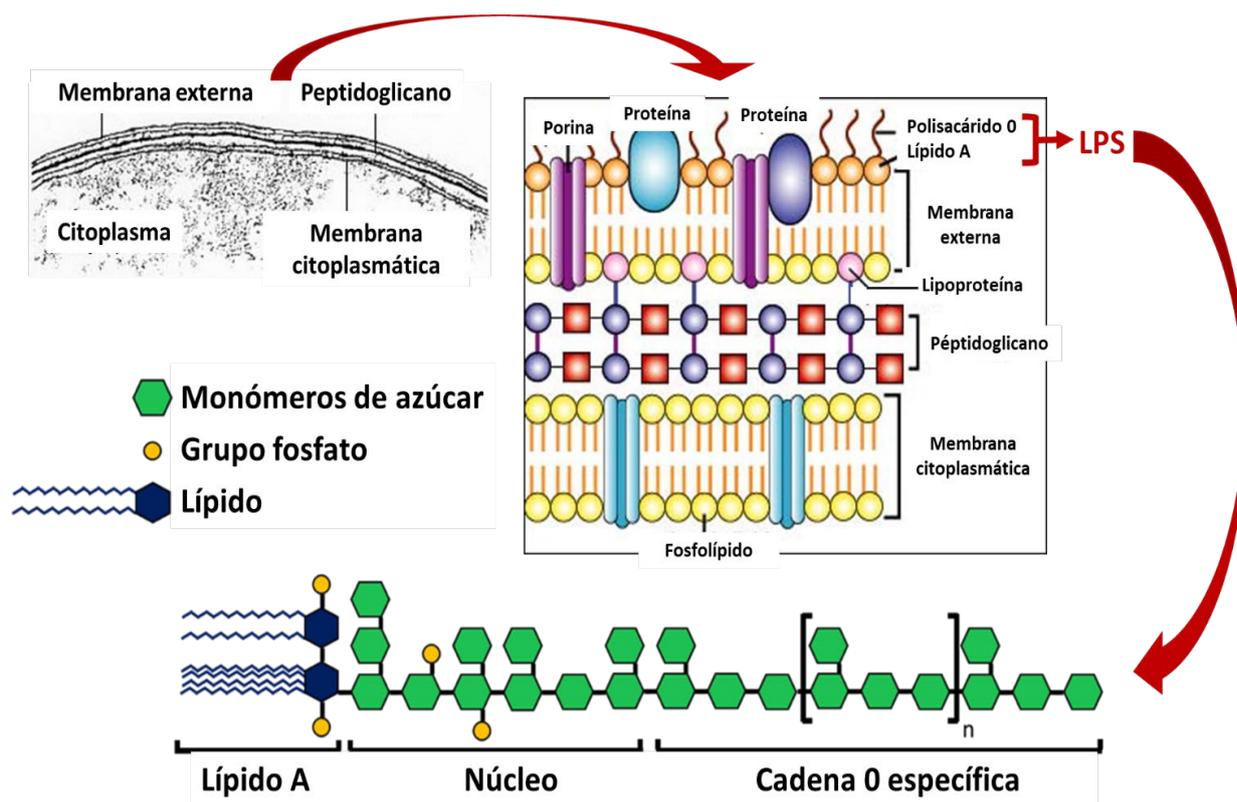


Figura 8: Disposición y estructura de la molécula de lipopolisacárido (LPS) en la pared celular de las bacterias Gram negativas.

Diferentes estudios han demostrado que existe una gran variabilidad en los monosacáridos que forman el complejo O específico y han permitido concluir que esta parte de la molécula del LPS es específica para cada endotoxina concreta, siendo característica de la bacteria de origen (serotipo específica) (Rietschel y col., 1996). Sin embargo, es importante conocer que un número importante de las bacterias Gram negativas patógenas expresan una endotoxina que carece de esta cadena O específica.

Al ser el área más externa y expuesta al medio, la cadena O es también el objetivo principal para las respuestas de anticuerpos desarrolladas por el hospedador y comúnmente es identificada como antígeno O. La gran variabilidad de esta región favorece la especificidad de la respuesta de anticuerpos del hospedador contra diferentes cepas bacterianas y también puede ser utilizadas para la tipificación serológica de aislados de las bacterias Gram negativas (Erridge y col., 2002; Netea y col., 2002).

Por su parte, el núcleo del LPS es estructuralmente menos variable y, a su vez, puede subdividirse en núcleo externo, formado por la cadena O-proximal, y el núcleo interno, que integra el lípido A (Rietschel y col., 1985). Mientras que la porción del núcleo externo o lípido A presenta variabilidad en la composición y en el enlace del azúcar, siendo los elementos comunes en esta región D-glucosa, D-galactosa, 2-amino-2-desoxi-D-glucosa y 2-amino-2-desoxi-D-galactosa, el núcleo interno de todas las endotoxinas sintetizadas por las bacterias Gram negativas contienen ácido 2-ceto-3-desoxioctulosónico y, principalmente, heptosa, residuos que, en su mayor parte, están fosforilados (Holst y Brade, 1992). Esta región presenta homología en las endotoxinas de diversos orígenes, como por ejemplo en *Salmonella enterica* y en *E. coli* y en muchas otras bacterias Gram negativas. De hecho, gracias a esta estructura conservada, se han desarrollado anticuerpos monoclonales que reconocen epítomos localizados en esta región de la endotoxina, permitiendo una reacción cruzada con todos los serotipos de bacterias de diferentes géneros y especies (Di y col., 1993).

Finalmente, el lípido A está compuesto por un elemento fosforilado, concretamente un disacárido de D-glucosamina unido a 1,6 y que lleva hasta seis residuos acilo. Aunque existe homogeneidad en esta región entre las endotoxinas de diferentes géneros y especies bacterianas, también se producen variaciones en la longitud, posición y número de ácidos grasos (Zähringer y col., 1994).

El lípido A se puede separar del polisacárido mediante un tratamiento con ácido suave y se ha demostrado que constituye el principio activo tóxico del LPS ya que la inoculación del lípido A purificado reproduce los efectos biológicos asociados al LPS (Galanos y col., 1985). Este hallazgo ha sido posteriormente confirmado mediante la utilización de la síntesis química completa del lípido A de *E. coli* y de sus componentes estructurales (llamado compuesto 506 o LA-15-PP).

La capacidad de este lípido A para inducir la liberación de citocinas es consecuencia de la presencia en la molécula de dos hexosaminas configuradas con glucosidos, dos grupos fosforilo y seis ácidos grasos, por lo que las modificaciones estructurales parciales del lípido A en alguno de estos elementos provocan una menor o incluso nula bioactividad sobre los monocitos de origen humano (Rietschel y col., 1992).

Además, la presencia y la posición de los seis ácidos grasos son importantes para la bioactividad del LPS. Así, la falta de los dos ácidos grasos secundarios, como ocurre en el lípido A tetraacilado precursor Ia (compuesto 406 o también conocido como lípido IVa o LA-14-PP), hace que esta molécula sea completamente inactiva (Kovach y col., 1990). Otro ejemplo de la importancia de estos ácidos grasos lo tenemos en el compuesto sintético LA-22-PP (del inglés *violaceum-type lipid A*), caracterizado por una distribución simétrica de los dos ácidos grasos secundarios, y que muestra una bioactividad muy limitada sobre los monocitos. De forma similar, estudios sobre el LPS de las especies *Rhodobacter sphaeroides* y *Rhodobacter capsulatus* presentan, de forma natural, un lípido A inactivo desde el punto de vista endotóxico y que también difiere en su patrón de acilación respecto del lípido A de *E. coli* (Loppnow y col., 1990).

Tanto el precursor sintético del lípido A como cualquiera de estas sustancias naturales mostraron una actividad de unión inalterada y antagonista que les permitieron competir con el LPS natural en el hospedador, concretamente compiten por la unión al receptor CD (del inglés *cluster of differentiation*) 14, la principal molécula de unión del LPS en los monocitos (Qureshi y col., 1991). Se ha demostrado que los monosacáridos sintetizados químicamente y relacionados con la parte no reductora del lípido A, como GLA27 y GLA60, pueden estimular los monocitos, mientras que el monosacárido sintético, denominado lípido X, es completamente inactivo al carecer de estos. Por lo tanto, se ha propuesto que es necesaria una estructura parcial del lípido A que disponga de un disacárido con dos residuos de hexosamina para poder ejercer una actividad endotóxica óptima, tanto *in vitro* como *in vivo* (Homma y col., 1990; Saiki y col., 1990).

2.2.3- Efecto del lipopolisacárido sobre el hospedador

La importancia de las endotoxinas radica en que, una vez incorporadas al hospedador, interaccionan con los receptores de membrana de las células del sistema inmunológico; así, la mayoría de las células sensibles al LPS son componentes del sistema inmunitario celular y la gran mayoría de estas células se activan con cantidades mínimas de LPS (Rietschel y Heine, 2001).

Cada tipo de célula reacciona de una manera específica y característica, pero, en general, estas reacciones conducen a la producción y/o liberación de mediadores, a fagocitosis, proliferación y/o diferenciación, tal y como se muestra esquemáticamente en la Figura 9 (WycKoff y col., 1998).

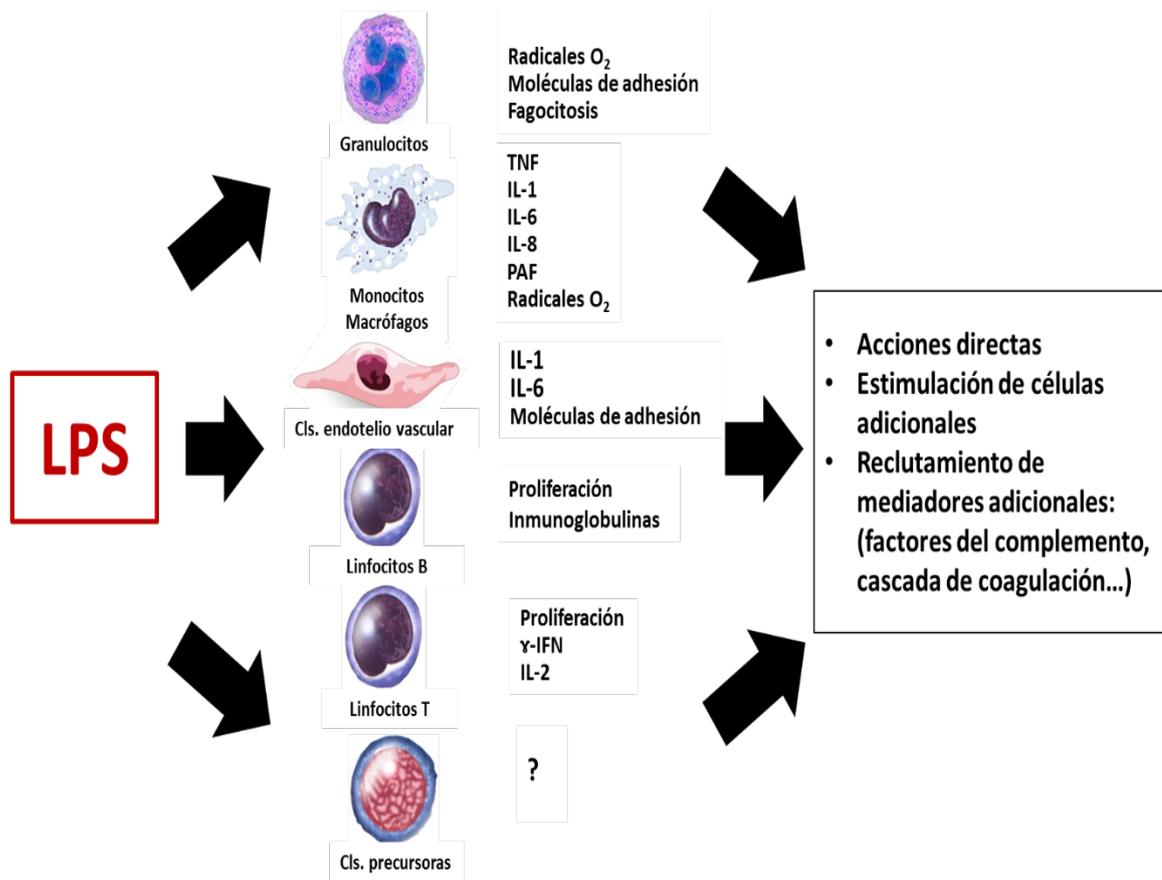


Figura 9: Efectos biológicos del lipopolisacárido (LPS) sobre diferentes células del sistema inmunitario.

Los mecanismos por los cuales la endotoxina alcanza la circulación sistémica no están completamente dilucidados, aunque hay dos mecanismos principales propuestos, la vía paracelular y la vía transcelular. El transporte paracelular implica el paso entre las células del endotelio vascular mientras que el transporte transcelular es el paso de las endotoxinas a través de las células epiteliales utilizando mecanismos de endocitosis mediada por receptores (Mani y col., 2012).

Centrándonos de forma específica en la glándula mamaria, las células epiteliales de la mama de los bovinos expresan los receptores TRL (*toll-like-receptor*); TLR-2 y TLR-4 y durante la mastitis, esta expresión está aumentada (Goldammer y col., 2004). Cuando estos receptores son estimulados por las bacterias o por el LPS se estimula por

parte de las células la producción de quimiocinas como la interleucina (IL)-8 que provocan la migración de neutrófilos a la zona. Además, se producen citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF), que sirven como mediadores de la inflamación. La producción coordinada de citocinas y de quimiocinas provoca el reclutamiento de neutrófilos hacia la ubre durante la infección. Así pues, las endotoxinas inducen cambios metabólicos relevantes en las células epiteliales bovinas de forma que estas son capaces de desencadenar respuestas proinflamatorias, antiinflamatorias y antioxidantes con el objetivo de mantener la homeostasis celular y solventar el desafío ante la exposición al LPS (Huang y col., 2019).

Desafortunadamente, este reclutamiento de los neutrófilos inducido por la acción de las endotoxinas sobre las células epiteliales mamarias causa el daño al epitelio de la glándula mamaria durante la mastitis causada por bacterias Gram negativas. Los mecanismos utilizados para destruir las bacterias, por tanto, también dañan el tejido de la propia glándula mamaria (Paape y col., 2003).

En este sentido, diferentes estudios han demostrado que la mastitis hiperaguda causada por bacterias Gram negativas se asocia con una enfermedad sistémica a consecuencia de un estado inflamatorio exacerbado desencadenado, al menos parcialmente, por el LPS bacteriano (Ziv, 1992), principal causante de la liberación de citocinas proinflamatorias (Ohtsuka y col., 2001). Las investigaciones de Bannerman y colaboradores permitieron comprobar la regulación positiva de estas citocinas asociada a la interacción de receptores o proteínas de unión con el LPS, incluidos la proteína de unión a LPS o LBP (del inglés *lipopolysaccharide binding protein*) y CD14 soluble, demostrando que la exposición vía intramamaria de vacas lecheras en mitad del periodo de lactación al LPS de *E. coli* provocaba una importante respuesta de citocinas con una sobreexpresión de proteínas que participan en el reconocimiento de productos de la pared celular bacteriana por parte del hospedador (Bannerman y col., 2004).

Un punto importante a resaltar es que diferentes estudios realizados en modelos murinos experimentales han puesto de manifiesto que las endotoxinas afectan a la función de barrera entre la leche y la sangre. Así, el estudio de Kobayashi y colaboradores demostró que la exposición intramamaria a LPS afectó negativamente a las funciones de la barrera leche-sangre tan solo tres horas después de la inoculación de la endotoxina (Kobayashi y col., 2013).

En sentido contrario, cabe destacar que la exposición de la ubre al LPS puede presentar ciertos aspectos ventajosos, particularmente ante infecciones posteriores. Petzl y colaboradores compararon vacas pretratadas con LPS, 72 o 240 h antes del desafío con *E. coli*. Los resultados del experimento revelaron que el pretratamiento con LPS limitó el desarrollo de una reacción febril y protegió frente a alteraciones en los recuentos de leucocitos circulantes (Petzl y col., 2012). No se detectaron signos clínicos de mastitis en los grupos pretratados con LPS en comparación con los animales del grupo de control que mostraron signos claros de mastitis durante las 24 horas inmediatamente posteriores al desafío con *E. coli*. Además, la carga bacteriana después del desafío con *E. coli* fue significativamente inferior en las vacas pretratadas con LPS en comparación con las vacas control. El pretratamiento con LPS produjo una disminución de la expresión de genes relacionados con la inflamación, como los que codifican TNF, CXCL-8 (del inglés *C-X-C Motif Chemokine Ligand 8*), amiloide sérico A3 o IL-6, mientras que, por el contrario, se demostró la regulación positiva de diversos genes antiinflamatorios en los animales control en comparación con los tratados con LPS.

De todo lo anteriormente expuesto podemos concluir, por tanto, que las endotoxinas juegan un papel muy relevante en la etiopatología de las mastitis por Gram negativos, afectando a las células del epitelio alveolar y extendiendo su radio de acción hacia la circulación sistémica para modificar la actividad de otros órganos.

2.2.4- Signos clínicos relacionados con la endotoxemia

La presencia de endotoxinas en sangre se denomina endotoxemia y se caracteriza por desencadenar una serie de manifestaciones clínicas asociadas a una reacción inflamatoria exacerbada y relacionada con una infección causada por bacterias Gram negativas (Figura 10).

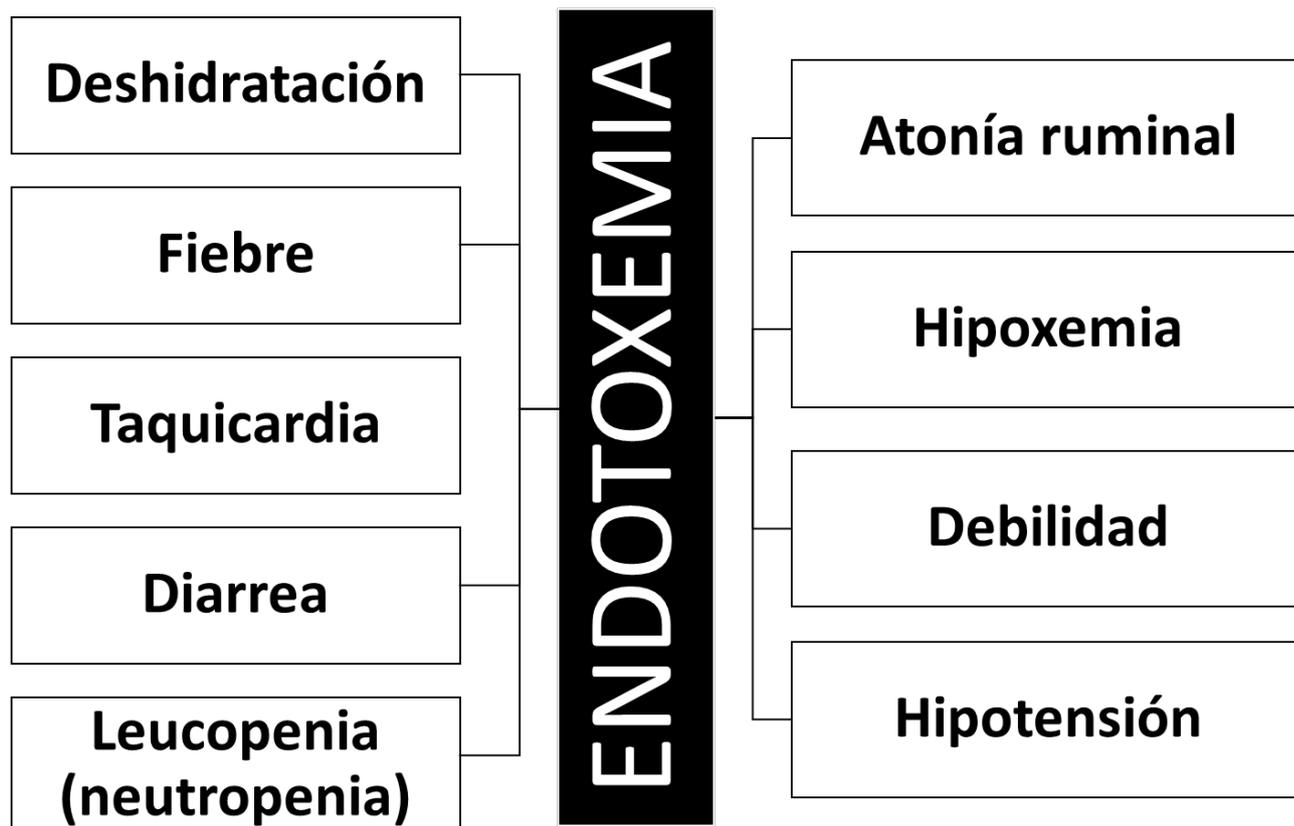


Figura 10: Representación esquemática de los principales signos clínicos de la endotoxemia en el ganado bovino.

2.2.4.1- Fiebre

Una de las manifestaciones clínicas más evidentes que ocurre durante la endotoxemia es la producción de mediadores de la inflamación que incluyen la IL-1, IL-6 y el TNF liberados por parte diferentes células del sistema inmunológico del animal afectado. Estas citocinas circulan en la sangre y cuando alcanzan el sistema nervioso central actúan directamente sobre el hipotálamo para inducir fiebre. Cabe mencionar que entre todas las citocinas, la IL-6 es el principal pirógeno endógeno (Cartmell y col., 2000).

2.2.4.2- *Hipomotilidad o atonía ruminal*

Diferentes trabajos de investigación han puesto de manifiesto que en el caso del ganado vacuno con endotoxemia otro de los signos clínicos observable es la hipomotilidad ruminal (Van Merit, 1987). Esta estasis ruminoreticular asociada con la endotoxemia parece ser el resultado combinado de, por un lado, un mecanismo dependiente de prostaglandinas y, por otro, de un mecanismo que involucra a los receptores adrenérgicos α -2 (Eades, 1997). Además de esta hipomotilidad ruminal, otros estudios han demostrado que, adicionalmente, la exposición a endotoxinas aumenta el tiempo de vaciado abomasal en el animal afectado (Vlaminck y col., 1985).

2.2.4.3- *Deshidratación*

El shock endotóxico se caracteriza por una reducción del volumen sanguíneo circulante efectivo, resultante de la acumulación de sangre en lechos venosos, por una disminución del volumen plasmático, y de un aumento de la permeabilidad vascular (Chien y col., 1966). Se ha demostrado que la endotoxemia en ganado vacuno induce una marcada hipovolemia (Constable y col., 1991) y este hecho hace imprescindible una adecuada fluidoterapia en estos animales.

2.2.4.4- *Leucopenia*

Los estudios de endotoxemia en el ganado bovino, tanto inducidos experimentalmente como naturalmente, han puesto de manifiesto que en todos los casos existe una disminución significativa en el recuento de glóbulos blancos (Saad y Ostensson, 1990). Se han observado tanto neutropenia como linfopenia, siendo la neutropenia la presentación más grave. La leucopenia, según diferentes estudios, parece resultar de una acumulación, marginación y activación inmediata de los leucocitos en la microcirculación, particularmente en los capilares alveolares, mientras que la linfopenia se ha atribuido, particularmente, a la liberación de corticosteroides endógenos (Deldar y col., 1984). Por su parte, la neutropenia parece ser resultado de un secuestro pulmonar de neutrófilos (Warner y col., 1988). Además, existen estudios que explican la trombocitopenia que se produce en el shock endotóxico como el resultado del secuestro

de plaquetas en los lechos capilares pulmonares, hepáticos y esplénicos (Tennant y col., 1975).

2.2.4.5- *Diarrea*

Diferentes estudios han descrito signos clínicos de diarrea como resultado directo de la endotoxemia en los rumiantes. Aunque no se ha dilucidado por completo el mecanismo por el cual las endotoxinas inducen esta diarrea, parecen estar involucradas en este proceso las prostaglandinas y el óxido nítrico (Liang y col., 2005).

2.2.4.6- *Hipotensión sistémica*

Se ha puesto de manifiesto que durante la endotoxemia se produce una disfunción circulatoria significativa, caracterizada por una disminución del gasto cardíaco e hipotensión sistémica (Olson y Brown, 1985).

2.2.4.7- *Taquicardia*

El ganado enfermo suele mostrar una frecuencia cardíaca elevada causada por el dolor, la hipovolemia relativa y la hipotensión sistémica, todo lo cual aumenta el tono simpático.

2.2.4.8- *Hipoxemia*

La endotoxina produce una respuesta pulmonar compleja en el ganado que incluye cambios tanto en las vías respiratorias como en la función vascular. Estas anomalías incluyen hipertensión pulmonar, cambios en la mecánica pulmonar, aumento de la permeabilidad microvascular, edema pulmonar, broncoconstricción, desajuste de ventilación, perfusión e hipoxemia grave. En comparación con otras especies, los rumiantes son muy sensibles a los efectos de las endotoxinas de forma que incluso pequeñas concentraciones pueden causar lesiones pulmonares graves (Brigham y col., 1986).

De forma general, podemos concluir este apartado de signos clínicos asociados con la endotoxemia indicando que cualquier vaca que tenga mamitis, metritis, peritonitis o enteritis aguda severa producida por bacterias Gram negativas puede llegar a tener endotoxemia y requerir un tratamiento urgente y agresivo de fluidoterapia, antibioterapia, analgesia y antipiréticos, como consecuencia de los efectos de las endotoxinas liberadas (Smith, 2005).

2.3- LIBERACIÓN DE ENDOTOXINAS INDUCIDA POR ANTIBIÓTICOS

La quimioterapia y más concretamente el uso de antibióticos constituye la principal estrategia para el tratamiento de las infecciones de la glándula mamaria de los bovinos y, ante una mamitis bacteriana, el criterio usado para la selección de los antibióticos más apropiados para el tratamiento está definido por el espectro conocido o determinado *in vitro* de sensibilidades a los antibióticos, las posibilidades relacionadas con la vía de administración a emplear y las especies y patologías para las que está registrado. Adicionalmente, en el caso de las infecciones por bacterias Gram negativas es importante tener en cuenta que se han descrito diferentes efectos adversos como consecuencia de la utilización de antibióticos para tratar la infección y que están relacionados con la liberación de endotoxinas.

Esta liberación de endotoxinas inducida por antibióticos varía en función del tipo de infección y agente infeccioso, de la localización de la infección, de la virulencia de las cepas implicadas, así como del modo de aplicación y de la dosis de antibiótico empleado. Así, diferentes antibióticos tienen diferentes efectos sobre la liberación de endotoxinas (Robert y col., 1993).

Desde los años sesenta existe un interés creciente por investigar el efecto de los antibióticos y otros compuestos sobre la liberación de endotoxinas. Rusmin y colaboradores demostraron en 1975 que la administración de antibióticos puede inducir la liberación de endotoxinas de bacterias retenidas en filtros intravenosos dispuestos en línea (Rusmin y Deluca, 1975). Poco después, Rosenthal reveló mediante microscopía

electrónica de barrido y transmisión que los antibióticos provocaban la formación de numerosas protuberancias o burbujas en la superficie de las células de *E. coli*, con aparente liberación de vesículas de membrana (Rosenthal y col., 1976), hecho que fue confirmado por Goodell y colaboradores en una nueva investigación que demostró que la penicilina aumentaba en gran medida el desprendimiento de lípidos y LPS al medio externo (Goodell y col., 1978).

Sin embargo, el efecto de los antibióticos sobre la liberación de endotoxina no ha sido completamente dilucidado, a pesar del creciente número de estudios tanto *in vitro* como sobre animales y de estudios clínicos. Algunos de estos estudios han puesto de manifiesto que la liberación de los LPS de las bacterias tras la interacción con los antibióticos está relacionada con un grupo de proteínas péptidoglicano-transpeptidasas (del inglés *Penicillin-binding proteins* o PBP) que se localizan en los espacios periplasmáticos de las membranas celulares de las bacterias Gram negativas y que participan en la síntesis de la pared celular (Jackson y Kropp, 1996). Estudios posteriores sobre este grupo de proteínas han permitido establecer una clasificación, en base a los efectos que causa la unión del antibiótico y la inhibición enzimática sobre el crecimiento bacteriano y la forma y/o lisis de las bacterias, clasificándolas en tres grupos, identificadas como PBP1, PBP2, PBP3 (Wyckoff y col., 1998). Las investigaciones sobre estas proteínas han permitido demostrar que aquellos antibióticos específicos para la unión con las PBP1 causan una muerte bacteriana rápida, con muy poca liberación de LPS; los antibióticos que tienen afinidad por los PBP2 provocan la pérdida de movilidad de la bacteria y la alteración de su forma, formando esferoplastos redondeados, sin lisis significativa y, por tanto, causando una liberación de endotoxinas muy baja; finalmente los antibióticos que interaccionan con las PBP3 conllevan a la conversión de la bacteria hacia una forma filamentosa, la cual continua su crecimiento anormal durante unas horas antes de su muerte celular y, por tanto, son las que producen la liberación de mayores cantidades de endotoxina (Trautmann y col., 1998).

Por tanto, la liberación de endotoxinas inducida por antibióticos, tanto *in vitro* como *in vivo*, está en dependencia de la clase de antibiótico, de la presencia de suero, del tipo de microorganismo, del lugar de acción del antibiótico o, incluso, esta liberación puede ser diferente en la lisis tardía o temprana, proporcional o no al número de patógenos eliminados, puesto que la morfología de las bacterias también puede influir en la liberación de endotoxinas (Crosby y col., 1994). Se ha demostrado que los animales

tratados con antibióticos pueden presentar mayores niveles de endotoxina que los animales no tratados. Así, la endotoxina plasmática puede aumentar, a pesar de la disminución de la bacteriemia. Diferentes antibióticos pueden causar una tasa de mortalidad bacteriana similar, pero con importantes diferencias en lo que respecta a la liberación de endotoxinas (Robert y col., 1993).

Algunos estudios realizados *in vitro* han demostrado diferentes grados de liberación de endotoxina tras la exposición de especies bacterianas Gram negativas a antibióticos bactericidas o bacteriostáticos (Crosby y col., 1994). Así, en estudios realizados con ciprofloxacina, una fluoroquinolona, se pudo demostrar que este antibiótico induce la liberación de endotoxinas, mientras que la gentamicina, un aminoglicósido, no lo hizo, a pesar de que ambos antibióticos provocan un efecto bactericida igualmente rápido. Esta diferencia se atribuye, por parte de los autores del estudio, a las diferencias en sus mecanismos de acción; así, aunque la ciprofloxacina actúa principalmente sobre la ADN girasa, los resultados mostrados en el estudio parecen indicar que también puede actuar sobre la pared bacteriana (Cohen y McConnell, 1986). Poco después, Kusser e Ishiguro lograron demostrar que estas diferencias eran, en realidad, consecuencia de una actividad inhibidora de los aminoglicósidos sobre la liberación de LPS en cultivos bacterianos de *E. coli* (Kusser y Ishiguro, 1988).

Todas las investigaciones realizadas en las últimas décadas sobre la liberación de endotoxinas inducida por los antibióticos coinciden en demostrar una considerable variabilidad en la liberación de LPS asociada a diferentes antibióticos durante su acción antibacteriana (Jackson y Kropp, 1996). Se ha comprobado que los antibióticos beta-lactámicos inducen mayor liberación de LPS que otras clases de antibiótico e, incluso, que existe variabilidad en la tasa de liberación en función de la subclase; así, por ejemplo, para el caso de los beta-láctamicos que incluyen a las familias de las penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos se ha descrito que los carbapenémicos liberan una cantidad significativamente menor de LPS que el resto de las subclases, existiendo, además, variabilidad en esta inducción dentro de una misma subclase (Morrison, 1996).

2.4- MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ENDOTOXINAS

Existen diferentes métodos para el análisis de endotoxinas, muy desarrollados y validados sobre todo en la industria farmacéutica, dada la importancia de detectar estas moléculas en productos farmacológicos. La detección de endotoxinas es fundamental para la seguridad de los pacientes de todo el mundo que dependen de la pureza de los tratamientos prescritos (Brent, 2017). Teniendo en cuenta que la reacción pirogénica puede ser desencadenada por la administración de tan solo 1 ng de endotoxina por kilogramo de peso corporal por hora (Aida y Pabst, 1990; Anspach, 2001; Petsch y Anspach, 2000; Gorbet y Sefton, 2005; Magalhães y col., 2007; Ongkudon y col., 2012), resulta indispensable para la industria farmacéutica detectar cantidades muy bajas de endotoxinas a fin de poder asegurar la calidad e inocuidad de los productos farmacéuticos.

La unidad internacional para las mediciones de concentración de endotoxinas está definida como UE o unidad de endotoxina y equivale a la actividad de 0,1 ng de endotoxina de *E. coli* (Schaumberger y col., 2015). Existen diferentes técnicas de detección biológica que incluyen la prueba de pirógenos en conejos (del inglés *rabbit pyrogen test* o RPT), el ensayo de lisado de amebocitos de *Limulus* (del inglés *Limulus amabocite lysate* o LAL) y el ensayo de sangre total bovina (del inglés *bovine whole blood assay*: bWBA), que utilizan diferentes métodos naturales de detección de endotoxinas y que, aunque siguen utilizándose en la actualidad, están siendo sustituidos por métodos de ensayo más nuevos y precisos, como los basados en biosensores (Schneier y col., 2020).

2.4.1- Test de pirógenos en conejos (RPT)

La más antigua y sencilla de las técnicas de detección de endotoxinas es el RPT y es un test basado en la inoculación de una muestra del producto a valorar en conejos vivos y la monitorización, consiguiente, de la reacción febril desarrollada por estos animales (Dullah y Ongkudon, 2017; Maloney y col., 2018).

Este método está fundamentado en el hecho biológico de que los conejos y los seres humanos comparten patrones de fiebre similares tras la exposición a las endotoxinas, habiéndose determinado que el incremento de la temperatura en 0,5 °C a lo largo de los 180 minutos siguientes a la inoculación de una muestra biológica constituye una evidencia de reacción febril (Gimenes y col., 2015). El límite de detección (del inglés *limit of detection* o LOD) o sensibilidad analítica de este procedimiento se ha fijado en 0,5 EU (unidades de endotoxina, del inglés *endotoxin units*) /mililitro (EU/ml), siendo considerado adecuado este valor en el momento del desarrollo de este método en 1912 (Hoffmann y col., 2005).

Esta técnica ha sido muy utilizada para la detección de endotoxinas por su precisión; además, al ser una técnica *in vivo*, resulta relativamente sencillo aceptar los resultados de la prueba, ya que se observan directamente los signos de endotoxemia por parte de los investigadores que la realizan. Sin embargo, en la actualidad está en desuso debido a razones de bienestar animal ya que provoca sufrimiento animal, así como su limitada sensibilidad y precisión en comparación con otros métodos de desarrollo más reciente (Vipond y col., 2016).

2.4.2- Ensayo en sangre total bovina (bWBA)

El ensayo en sangre total bovina (“*bovine Whole Blood Assay*” o bWBA) está basado en la utilización de sangre total de vacuno que se introduce en una solución que contiene el fármaco que se desea analizar (Gall y col., 2006). En respuesta a la presencia de endotoxina, los glóbulos blancos de la sangre total bovina producirán prostaglandina E2 (PGE2) generando una respuesta inflamatoria similar a la de los humanos (Wunderlich y col., 2015). Esta producción de PGE2 es directamente proporcional a la concentración de endotoxina en la muestra. De acuerdo a varios estudios, esta técnica puede detectar con precisión endotoxinas en concentraciones cercanas a 0,25 EU/ml (Schindler y col., 2006; Wunderlich y col., 2015).

El ensayo bWBA es relativamente fácil de realizar y requiere pocos pasos preparatorios (Dullah y Ongkudon, 2017), pero no está exento de limitaciones. Así, la lectura a lo largo del tiempo no es muy estable a consecuencia de interferencias con las interacciones moleculares de los reactivos del ensayo, existe una unión inespecífica de

las endotoxinas con otros receptores de células sanguíneas o se puede producir el enmascaramiento de los monómeros de endotoxina por parte de algunos de los reactivos del ensayo.

Otro inconveniente adicional que presenta esta técnica es que la sangre total necesaria para las pruebas sólo puede obtenerse de terneros muy jóvenes, lo que dificulta su obtención en grandes cantidades.

2.4.3- Ensayo con lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL)

A diferencia del ensayo en conejo o RPT, el ensayo LAL desarrollado en la década de 1960 no utiliza animales vivos para la detección de endotoxinas, siendo más preciso y con mayor sensibilidad analítica o lo que es lo mismo, permitiendo límites de cuantificación menores. Al igual que ocurre en las técnicas de bWBA se basa en la utilización de material biológico, en este caso un extracto de la sangre de la especie *Limulus polyphemus* o cangrejo herradura (Jin y col., 2018; Ong y col., 2006).

El cangrejo herradura del Atlántico es una especie de quelicerado xifosuro de la familia Limulidae que llega a alcanzar, en su estado adulto, una longitud de 60 cm y una anchura de 30 cm. A pesar de su nombre, esta especie está más próxima a las arañas y escorpiones que a los cangrejos, con los que no guarda ninguna relación. Su nombre hace alusión a su aspecto que asemeja una herradura de caballo. Por su parte, el nombre científico hace referencia a su conducta y a su aspecto. Así, *Limulus* indica que esta especie habita en ambientes lodosos mientras que *polyphemus* hace alusión a sus ojos que aparentan estar en medio de la frente y se asemejan a los de Polifemo, personaje de la mitología griega dotado de un ojo en la frente. Esta especie se distribuye de forma natural por las costas de la península de Yucatán en México y en la costa Atlántica de los EE.UU., tal y como se muestra en la Figura 11.

Se trata de una de las pocas especies consideradas como fósiles vivientes puesto que están presentes en la tierra desde hace más de 400 millones de años, habiendo coexistido con los dinosaurios y con los primeros homínidos. Tienen cierta semejanza con los trilobites, extinguidos hace unos 250 millones de años, pero prácticamente no han sufrido cambios evolutivos.

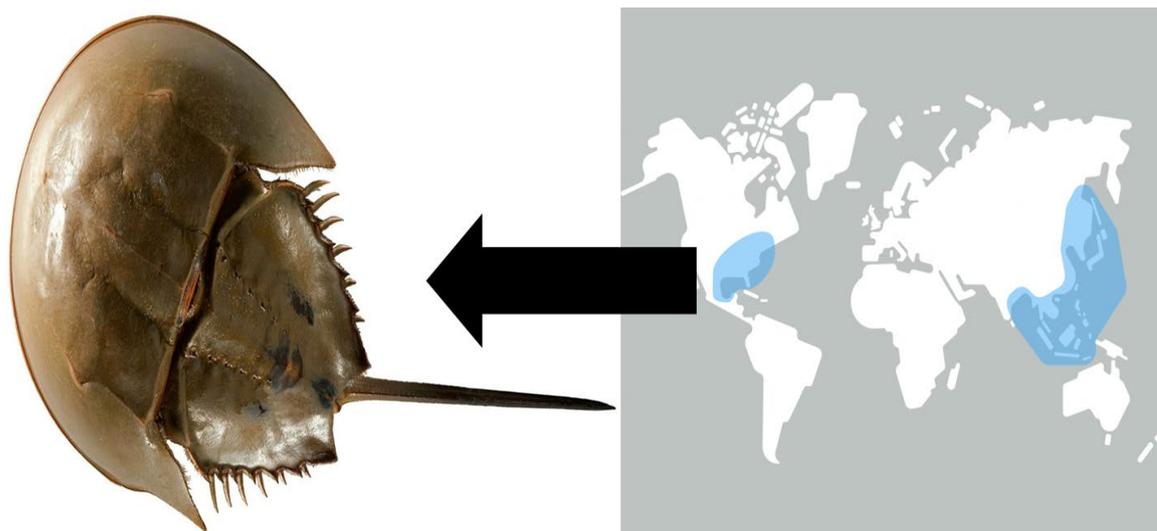


Figura 11: Aspecto y distribución mundial del cangrejo de herradura (*Limulus polyphemus*) y de otros xifosuros.

La importancia de esta especie radica en que las células sanguíneas contenidas en su hemolinfa, llamadas amebocitos, son enormemente sensibles a la acción de las endotoxinas bacterianas y reaccionan produciendo la coagulación de la hemolinfa como mecanismo de protección. Desde su descubrimiento por Levin y Bang en 1964 (Levin y Bang, 1964) se ha afianzado su uso para la detección y cuantificación de las endotoxinas bacterianas, existiendo en la actualidad tres metodologías principales basadas en su empleo, el método de coágulo de gel (gel-clot), los métodos cromogénicos y los métodos turbidimétricos.

El método gel-clot implica mezclar partes iguales de extracto de LAL y de muestra. Si reaccionan formando un gel y esta mezcla permanece intacta en el fondo del tubo, la prueba es considerada positiva (Sakai y col., 2004). Esta lectura implica que la muestra tiene suficientes endotoxinas para desencadenar la reacción y se ha determinado que el límite de detección oscila entre 0,03 y 0,06 EU por ml.

Por su parte, los métodos cromogénicos y turbidimétricos son ensayos fotométricos y requieren un fotómetro para su lectura. El ensayo cromogénico se realiza sustituyendo un sustrato natural de la reacción, el coaguleno, por uno cromogénico o coloreado. Este sustrato cromogénico es escindido por la enzima coagulasa activada por las endotoxinas y la molécula cromogénica se libera, generándose un cambio de color que

se mide empleando espectrofotometría (Dolejš y Vaňousová, 2015). Por su parte, los métodos turbidimétricos son similares a los cromogénicos, pero miden la turbidez de la solución (Joiner y col., 2002). En ambos casos, los índices de turbidez y cambio de absorbancia son proporcionales a la concentración de endotoxina en la muestra problema. Para ambos métodos es posible medir el tiempo necesario para que la mezcla de reacción alcance una absorbancia o turbidez determinada, o lo que es lo mismo, es posible cuantificar la velocidad de desarrollo de la reacción.

Estos tres métodos tienen un mismo mecanismo de acción; se basan en una misma proteína, la cascada de coagulación del factor C que se encuentra en la sangre de los cangrejos herradura. La endotoxina activa este factor C, que a su vez activa el factor B tras la formación de una enzima de coagulación (Iwanaga, 2007; Muta y col., 1991). En los ensayos de coagulación en gel y de turbidez, esta enzima de coagulación es la que actúa transformando el coaguleno en coagulina, creando el gel y el agente de turbidez, respectivamente. Por el contrario, el método cromogénico no utiliza coaguleno, sino que se basa en la utilización de un complejo de aminoácidos y p-nitroanilina (pNA) como factor cromogénico. La enzima elimina la pNA del complejo, lo que genera un color amarillo en la suspensión que es directamente proporcional a la concentración de endotoxina (Dullah y Ongkudon, 2017).

Existen tres tipos de ensayos cromogénicos: dos ensayos de punto final y un ensayo cinético (Dawson, 1995; Lindsay y col., 1989). En los ensayos cromogénicos de punto final, la reacción de la liberación de pNA se detiene añadiendo ácido; la diferencia entre los dos ensayos de punto final es la conjugación de un compuesto di-azo con el pNA, que en uno de los métodos permite leer la absorbancia a 540 nm en comparación con la lectura a 405 nm para el pNA utilizando el segundo. El cambio en la absorbancia evita interferencias para aquellas muestras que absorben la luz a 405 nm. Por su parte, el ensayo cromogénico cinético mide la absorbancia del pNA a intervalos de tiempo regulares a lo largo de la prueba.

El método turbidimétrico, al igual que el cromogénico, tiene dos variantes: un método de punto final y un método cinético. En el método turbidimétrico de punto final, las muestras se miden al cabo de un determinado tiempo de incubación. Por el contrario, en el método turbidimétrico cinético, la densidad óptica se mide repetidamente durante todo el ensayo.

Todas estas pruebas están ampliamente aceptadas como métodos oficiales para la detección de endotoxinas por la comunidad farmacéutica, aunque varían en lo que respecta a los límites de detección (Chen y Mozier, 2013). Aparecen recogidos en las farmacopeas europea, británica y americana, estando indicados para la detección de endotoxinas tanto en aguas como en productos farmacológicos. Además, existen normas UNE (Asociación Española de Normalización) que recogen las directrices para determinar endotoxinas en diferentes matrices, por ejemplo, en el aire, UNE-EN (EN: Norma Europea del inglés *European norm*) 14031:2021, o en muestras de nanomateriales, UNE-EN ISO (las siglas ISO corresponden a International Organization for Standardization u Organización Internacional de Normalización) 29701:2010, y para comprobar que no existen contaminaciones por Gram negativos en sistemas y reactivos empleados en cultivos celulares mediante el ensayo LAL, ISO 29701:2010. Sin embargo, cabe mencionar que no existen metodologías normalizadas para la detección de endotoxinas en leche.

Aunque el método LAL es más preciso y sensible que el RPT, es importante destacar que presenta varios inconvenientes. Estos ensayos LAL pueden generar resultados erróneos, tanto falsos negativos como falsos positivos. Los resultados falsos negativos se producen cuando las endotoxinas quedan enmascaradas por las matrices de formulación del producto, como los componentes de las soluciones tampón (por ejemplo, tampones citrato o tampones fosfato), las composiciones del medio de cultivo celular y los tensioactivos (p. ej., polisorbato 20 y polisorbato 80) o por agregación con los productos (Nakamura y col., 1986; Schneider, 2020; Schwarz y col., 2017). Además, los ensayos LAL pueden presentar reacciones positivas falsas cuando se activa la vía de la enzima proteasa factor G por la acción de (1→3)-β-D-glucano, un componente principal de la membrana celular de muchos procariontes y eucariotes y que da lugar a la formación del mismo producto final de proteína coagulina que se genera en la cascada de reacciones de LAL (Elin y Wolff, 1973; Morita y col., 1981) (Figura 12).

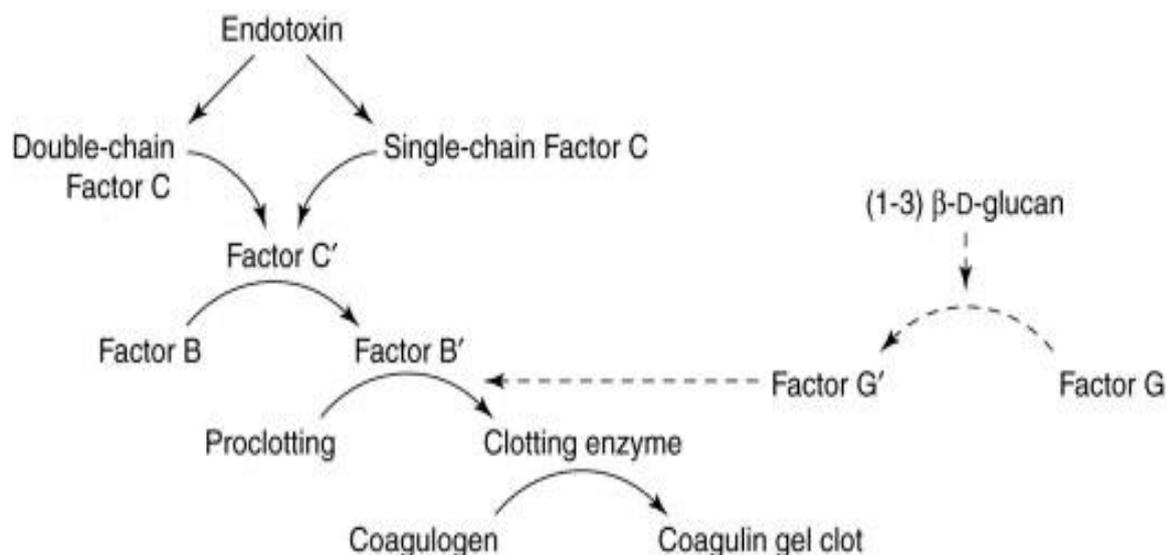


Figura 12: Cascada enzimática en la reacción que ocurre en el ensayo de Limulus amebocite lysate (LAL). Adaptada de Williams (2007).

Los (1,3)-β-D-glucanos son compuestos polisacáridos constituidos por monómeros de glucosa, específicamente monómeros de D-glucosa, unidos a través de enlaces β-glicosídicos, que son producidos por muchos organismos procariontas y eucariotas (Theel y Doern, 2013). Una de las principales fuentes de contaminación de glucanos en los laboratorios proviene de la celulosa del papel. Dado que las operaciones de filtración son un proceso habitual en la mayoría de los laboratorios y se realizan en muchas ocasiones utilizando papel de filtro de celulosa, no es extraño encontrar que las muestras que se analizan para detectar la presencia de endotoxinas bacterianas contengan (1,3)-β-D-glucanos introducidos por las fibras de estos mismos filtros (Sandle, 2013). En muchos casos, no se llega a realizar un examen completo de los filtros antes del ensayo, lo cual permite la lixiviación de los glucanos que finalmente terminan en el filtrado. Por ello, es necesaria la validación previa de todos los filtros que puedan ser empleados en el desarrollo de técnicas para la determinación de actividad de endotoxina.

Además, las muestras pueden estar contaminadas por el contacto con otros organismos productores de glucanos. Los glucanos contaminantes pueden provenir de diferentes fuentes como el zimomano de las levaduras, la laminarina de las algas, la lentinana de las setas Shiitake (a menudo usado como fármaco antitumoral) o el curdlan que producen algunas bacterias (Neun y col., 2020).

Se ha descrito que las cascadas de proteínas en las que se basa el ensayo de LAL también pueden verse alteradas en muestras con iones metálicos libres, proteínas, péptidos y polímeros que se unen al sitio activo de las endotoxinas, neutralizando su actividad biológica (Bhunja y col., 2009; Mares y col., 2009).

2.4.4- Nuevas técnicas para la cuantificación de endotoxinas

Debido a la importancia anteriormente mencionada de la detección de estas moléculas se continúan desarrollando técnicas que permitan modernizar la cuantificación de endotoxinas, buscando herramientas alternativas que minimicen la utilización de modelos animales o de reactivos de origen animal. Entre estas técnicas se encuentran pruebas electroquímicas, ópticas, basadas en masas y pruebas basadas en el factor C, una parte de la cascada proteica activada por endotoxinas que puede ser obtenida como proteína recombinante (Schneier y col., 2020). Todas ellas representan el futuro en la detección de endotoxinas y, muy probablemente, alguna de ellas terminará sustituyendo a las pruebas actuales.

2.4.4.1- Ensayo del factor C recombinante (rFC)

El factor recombinante C o rFC es una proteína sintética sensible a la endotoxina que se ha clonado a partir del ADN que codifica el factor C y que puede ser utilizada en un ensayo LAL *in vitro* alternativo (Levin y Bang, 1968; Nakamura y col., 1986; Iwanaga, 1993; Ding y col., 1995; Maloney y col., 2018). En este ensayo, la unión de la endotoxina activa las moléculas rFC sintéticas que escinden un sustrato de fluoresceína, amino-metilcumarina que resulta en la generación de un compuesto fluorogénico. La fluorescencia se mide mediante excitación/emisión a 380/440 nm, en ausencia y presencia de endotoxinas, y la diferencia en esta fluorescencia es proporcional a la concentración de endotoxinas en la muestra. La rFC es específica para la detección de endotoxinas, eliminando la dependencia de la unión inespecífica de glicanos, como ocurre en los ensayos LAL clásicos, minimizando la posibilidad de resultados falsos positivos (Ding y Ho, 2001). El rango de sensibilidad analítica de esta técnica está entre 0,05 y 500 EU/ml (Ding y col., 1995). A pesar de su bajo límite de detección en condiciones de laboratorio, este ensayo de rFC es propenso a la contaminación en entornos de campo, lo que

compromete seriamente su utilidad (Barnett y col., 2012), y depende de la estabilidad de las proteínas rFC. Este ensayo está basado en fluorescencia y requiere un fluorómetro para las lecturas. Aunque puede no ser tan rentable como las mediciones rápidas de absorbancia utilizando el ensayo LAL, la disponibilidad de un lector de microplacas de fluorescencia en muchos laboratorios equipara el coste y disponibilidad de ambos modos de detección (Reynolds y col., 2002; Thorne y col., 2010).

2.4.4.2- Técnicas de biosensores

En la actual era digital se han diseñado nuevos métodos para la detección de endotoxinas utilizando nuevas tecnologías diseñadas en base a enfoques más sintéticos. Estas técnicas representan los futuros métodos de detección que, muy probablemente, acabarán sustituyendo a las pruebas de RPT y LAL y que pueden dividirse en tres categorías: técnicas electroquímicas, ópticas y basadas en la masa.

La mayoría de los biosensores electroquímicos se basan en un principio denominado espectroscopía de impedancia electroquímica o EIS (del inglés *Electrochemical Impedance Spectroscopy*). Para realizar una EIS es necesario disponer electrodos dentro de la solución que se desea analizar y enviar una señal de corriente alterna sinusoidal a través de la misma, con una tensión que oscila entre 2 y 10 mV (Honeychurch, 2012). Variando la frecuencia de estas ondas sinusoidales se puede crear un espectro de impedancia. Las proteínas neutralizadoras de endotoxinas o ENP (*endotoxin neutralizing proteins*), que son altamente selectivas a los componentes de la endotoxina, se unen a estos electrodos de tal manera que si las endotoxinas entran en contacto con el complejo electrodo-proteína, se unen a las mismas (Priano y col., 2007; Syaifudin y col., 2011). Cuando las endotoxinas se unen a las ENP en los electrodos, aumenta la resistencia del electrodo. Yeo y colaboradores (Yeo y col., 2011) emplearon un electrodo hecho de oro y un complejo de proteínas humanas recombinantes tipo toll (*toll-like receptor 4* o rhTLR4 y *myeloid differentiation-2* o MD-2); exponiendo los electrodos a soluciones con diferentes concentraciones de endotoxina reprodujeron espectros de impedancia diferentes para cada una de estas concentraciones. La corriente máxima a través de todas las diferencias de potencial fue menor a las concentraciones más altas de endotoxina (Mansor y col., 2018). Este estudio demostró que este biosensor

en particular tenía una alta especificidad hacia las endotoxinas, siendo de utilidad para evitar resultados falsos positivos.

Las técnicas ópticas se basan en el empleo de un sensor óptico basado en cristal líquido (LC) para la detección altamente sensible de endotoxinas. Los biosensores ópticos basados en LC se desarrollan utilizando aptámeros de ADN monocatenario específicos de endotoxinas, oligonucleótidos de cadena sencilla con tamaños entre 70 y 100 nucleótidos y capaces de reconocer de forma específica y con alta afinidad a las endotoxinas a través de un plegamiento tridimensional de la cadena. Los biosensores ópticos basados en LC tienen una capacidad de detección lineal de endotoxinas que oscila entre 0,05 y 1.000 EU/ml. Estos biosensores ópticos tienen una reactividad de unión cruzada insignificante con otras biomoléculas, maximizando así la sensibilidad y especificidad de la detección (An y Jang, 2019).

En términos generales, estas técnicas ópticas se pueden dividir en tres categorías distintas, luminiscencia, resonancia de plasmón superficial (del inglés *surface plasmon resonance*: SPR) y electroquimioluminiscencia. Todas ellas comparten la característica común de estar basadas en cambios visuales.

El método de bioluminiscencia se basa en el mismo principio del ensayo de LAL, aunque en este caso el material de punto final o pNA de los ensayos de LAL se emplea como material de partida para la acción de la enzima luciferasa (Noda y col., 2010; Paul y col., 2016). El pNA modificado con luciferina se había diseñado como sustrato para una versión mutada de la luciferasa producida por luciérnagas (*Photinus pyralis*) que identificaba con rapidez y precisión soluciones que contenían endotoxinas mediante una reacción de bioluminiscencia (Noda y col., 2010). La reacción genera una alta intensidad de luminiscencia, con una luminiscencia 20 veces más intensa que la producida por la luciferasa estándar de tipo salvaje (Fujii y col., 2007). La concentración más baja de endotoxina registrada utilizando luciferasa original o salvaje es de 0,01 EU/mL, mientras que el límite de detección de la técnica de bioluminiscencia basada en luciferasa de tipo mutante es de 0,0005 EU/ml (Dullah y Ongkudon, 2017). El tiempo de detección es de 15 minutos, claramente más rápido que en las técnicas de coagulación en gel de LAL, que requieren un tiempo estimado entre de 90 y 140 minutos (Ostronoff y Lourenço, 2015).

En lo que respecta a las técnicas basadas en masas cabe destacar la SPR. Zhang y colaboradores han descrito una plataforma de biosensores para teléfonos inteligentes basada en SPR. Dispone de un chip sensor desechable que utiliza el sistema de flash incorporado al teléfono inteligente como fuente de luz y una unidad compacta de rejilla de difracción y dispersión espectral (Zhang y col., 2018), aunque la tecnología aún está en proceso de desarrollo. Una publicación más reciente basada en biosensores plasmónicos mediados por antibióticos para la detección de endotoxinas ha demostrado un límite de detección de 40 EU/ml (Manoharan y col., 2019). El biosensor plasmónico está basado en una tecnología de sonda de fibra óptica doblada en U o UFOP (del inglés *U, fiber optic probe*) que utiliza triclorosilano octadecil o OTS (del inglés *octadecyltrichlorosilan*) en la superficie de las sondas de fibra óptica para atrapar hidrofólicamente la endotoxina presente en soluciones acuosas. La unión de las endotoxinas se monitoriza en tiempo real midiendo el cambio en el índice de refracción en la capa evanescente (Manoharan y col., 2019). Para añadir especificidad y amplificar la señal, las endotoxinas unidas se marcan con nanopartículas de oro conjugadas con polimixina B o PMB (del inglés *polymixin B*), un antimicrobiano (PMB-AuNPs del inglés *Au (gold) nanoparticles*), en un formato de sándwich que funciona como un biosensor de fibra óptica basado en absorbancia. El límite de detección está próximo a los 40 EU/ml obteniéndose el resultado en un tiempo de ensayo de tan solo 1 hora.

Un último ejemplo de técnicas basadas en masas son los sensores acústicos piezoeléctricos electromagnéticos o EMPAS (del inglés *electrospun micropylamid arrays*) que se caracterizan por ser capaces de medir múltiples tipos de pirógenos y no exclusivamente endotoxinas. Además, son capaces de detectar endotoxinas en tiempo real en muestras de plasma sanguíneo humano (Sheikh y col., 2016). Las técnicas basadas en EMPAS utilizan sensores de ondas acústicas de frecuencia ultraalta basados en una plataforma de superficie mixta ultrafina a base de oligoetilenglicol recubierta sobre discos de cuarzo piezoeléctricos. El extremo de glicol de la superficie de cuarzo está recubierto con PMB, un antibiótico peptídico cíclico que muestra una gran afinidad por las endotoxinas y, por tanto, se utiliza como ensayo biosensor para la detección de endotoxinas. Un estudio demostró que la incubación de sangre total contaminada con endotoxinas con microesferas de PMB produce un cambio de frecuencia resonante EMPAS (Δf) que es proporcional a la concentración de endotoxinas en un rango entre 30-60 EU/ml (Sheikh y col., 2016).

El uso generalizado de técnicas para la detección y cuantificación de la actividad de endotoxinas en la industria farmacéutica y su evolución en la era digital contrasta con su limitado empleo en otras áreas donde no existen metodologías normalizadas para la detección de endotoxinas, como es en el caso de la leche. La mayoría de los trabajos sobre este sustrato utilizan las técnicas LAL, pero no llevan a cabo una adecuada validación de la técnica en base a la matriz de la muestra, ni a su tratamiento para evitar interferencias durante el ensayo, no reportando datos sobre la exactitud, precisión, repetibilidad o reproducibilidad.

3- OBJETIVOS

La liberación de endotoxinas juega un papel muy relevante en la patogenia y la evolución clínica de las mastitis causadas por bacterias Gram negativas. El objetivo del presente estudio es conocer la dinámica de la liberación de endotoxinas inducida por diferentes tratamientos antibióticos empleados de forma rutinaria en el manejo de estas mastitis en el ganado bovino. La hipótesis de partida es que esta liberación varía en función del tratamiento empleado y de su efecto, bactericida y/o bacteriostático, sobre el crecimiento bacteriano en la glándula mamaria.

Este objetivo general se ha alcanzado a través de la consecución de los siguientes objetivos específicos:

- Puesta a punto y validación de un ensayo turbidimétrico para la detección y cuantificación de la actividad de endotoxinas en muestras de leche.
- Puesta a punto de un sistema *in vitro* para simular las condiciones de la infección por bacterias Gram negativas en la ubre bovina.
- Evaluación del efecto de diferentes antibióticos sobre el crecimiento bacteriano y la liberación de endotoxinas en leche bovina.
- Evaluación del efecto del género/especie bacteriano implicado en la infección sobre el crecimiento y la liberación de endotoxinas tras el tratamiento antibiótico en leche bovina.

4- MATERIAL Y MÉTODOS

4.1- DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ENDOTOXINAS EN MUESTRAS DE LECHE

El método elegido para la detección y cuantificación de la actividad de endotoxina en este estudio es el identificado como método C en la Real Farmacopea Española (2.6.14), una técnica turbidimétrica cinética que se ha adaptado y validado para la matriz leche.

Se trata de un ensayo fotométrico que cuantifica el aumento de la turbidez durante la reacción de la muestra problema con el lisado de amebocitos de *Limulus*, a consecuencia de la interacción con las endotoxinas presentes. La determinación del tiempo transcurrido para que esta reacción alcance una absorbancia predeterminada o, lo que es lo mismo, la estimación de la velocidad de desarrollo de la turbidez permite determinar la concentración o actividad de endotoxinas en la muestra.

Como primer objetivo de este trabajo nos propusimos la optimización de esta técnica para la matriz leche, validando la técnica mediante la determinación de los parámetros de precisión, exactitud e incertidumbre, así como la repetibilidad y reproducibilidad.

4.1.1- Toma de muestras y conservación

Para validar el método de análisis de endotoxinas se utilizaron muestras de leche bovina de diversos orígenes, seleccionadas con el fin de proporcionar un amplio rango de concentraciones.

De esta manera, fueron seleccionadas para el estudio inicial 10 muestras de leche cruda procedentes de vacas con mamitis clínica, todas ellas seleccionadas entre las muestras enviadas para diagnóstico etiológico de esta patología a Laboratorios Agrovét S.L. (Mansilla Mayor, León, España). Todas estas muestras procedían de granjas en las que el veterinario había realizado un diagnóstico presuntivo de mamitis con potencial implicación de bacterias Gram negativas en base a los signos clínicos; los animales afectados mostraban hinchazón de la ubre, afectando a uno o varios cuarterones, junto

con enrojecimiento y/o edema. Para todas estas muestras se había solicitado al laboratorio la realización de un diagnóstico etiológico y ninguno de estos animales estaba recibiendo tratamiento alguno en el momento del muestreo. Este grupo de muestras constituyó el grupo con una concentración teórica elevada de endotoxinas.

Además, se emplearon cinco muestras de leche del tanque de diferentes granjas de bovino de leche que fueron recogidas del tanque de almacenamiento en refrigeración de la lechería. Este grupo de muestras constituyó el grupo con una concentración teórica moderada o intermedia de endotoxinas.

Por último, se incluyeron cinco muestras de leche comercial tratada térmicamente (del inglés *ultrahigh temperature* o UHT). La inclusión de este tercer grupo de muestras permitió optimizar y validar la técnica para la detección de endotoxinas en el rango más bajo de concentración.

Para las muestras de leche cruda, tanto de vacas con mamitis clínica como de tanque de leche, se recogió, asépticamente, un volumen cercano a 5 ml de leche en tubos Falcon estériles de 50 ml, transportándose en refrigeración hasta el laboratorio, donde se identificaron y almacenaron inicialmente a 4°C. De cada una de las muestras se empleó 1 ml, recogido en condiciones estériles, para el diagnóstico microbiológico convencional y para la determinación del recuento de células somáticas (RCS). El volumen restante de muestra se almacenó a -20°C hasta su procesamiento para la determinación de la actividad de endotoxinas.

En el caso de las muestras de leche comercial no se llevaron a cabo cultivos microbiológicos ni RCS. A partir del envase comercial y en el mismo día de la determinación de endotoxinas se alicuotaron, en condiciones de esterilidad, muestras con un volumen de 5 ml en un tubo Falcon estéril.

4.1.2- Determinación de la actividad de endotoxina

La actividad de endotoxina en las muestras de leche se cuantificó mediante un ensayo turbidimétrico cinético en el que cada muestra se mezcla con el reactivo o sustrato LAL (del inglés *Limulus ameobocite lysate*), se coloca en un lector turbidimétrico a 37°C y se monitoriza automáticamente durante el tiempo de incubación. El tiempo necesario

de incubación para que se desarrolle un cierto grado de turbidez, denominado generalmente tiempo de reacción, es inversamente proporcional a la cantidad de endotoxina presente en la muestra. Finalmente, la concentración de endotoxina en las muestras se puede estimar mediante la comparación de este tiempo de reacción en la muestra problema con el determinado para una curva estándar con diferentes concentraciones de endotoxina.

Todos los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos (96 well Endosafe-plates, Charles River) y utilizando un kit comercial de detección de endotoxinas (Kinetic turbidimetric LAL, Charles River), diseñado para la medición de endotoxinas en agua y/o productos farmacéuticos. Se realizaron lecturas de turbidez a 340 nm cada 30 segundos durante un tiempo de incubación de una hora empleando un lector turbidimétrico, BIOTEK ELx808LBS (Lonza) con número de serie 208040, un equipo que es utilizado de manera rutinaria en los Laboratorios Analíticos Agrovét S.L. para la determinación de endotoxinas en aguas y productos farmacológicos (Figura 15). La temperatura de incubación de las placas fue de 37°C.

Todo el material utilizado para el ensayo LAL, incluyendo fungibles de plástico, reactivos y agua, estaba libre de endotoxinas. Además, la totalidad del ensayo se realizó en cabina de seguridad biológica para evitar contaminaciones exógenas que pudieran interferir en los resultados.

4.1.2.1- Preparación de las muestras

Las muestras de leche que se habían almacenado a -20°C se descongelaron hasta alcanzar temperatura ambiente. Con objeto de eliminar posibles sustancias interferentes para el análisis, se llevó a cabo el filtrado de 1 ml de cada muestra a través de un filtro de polivinilideno de fluoruro (PVDF) con un tamaño de poro de 0,45 µm (Millex-HV, Merck-Millipore), con la ayuda de una jeringa estéril. El filtrado se recogió en un microtubo Eppendorf de 1,5 ml estéril y se conservó en refrigeración a 4°C, empleándose para realizar las diluciones que se emplearon en el ensayo. Para esta dilución se empleó agua certificada libre de endotoxinas, preparándose las diluciones 1:500 y 1:1.000.

Cuando existieron problemas en la filtración primaria de la muestra original, a consecuencia de la saturación del filtro, se realizaron las diluciones 1:500 y 1:1.000 en una etapa inicial, sometiéndolas seguidamente a la misma filtración.

El efecto del proceso de filtrado sobre la determinación de endotoxinas fue valorado sobre réplicas de los patrones de endotoxina a diferentes concentraciones, que fueron valorados antes y tras la filtración.

4.1.2.2- Preparación de la recta de calibración

Para la preparación de la recta de calibración se empleó un estándar comercial de endotoxina certificado CSE (*Escherichia coli* -*E. coli*-, Charles River), que fue resuspendido en agua ultrapura libre de endotoxinas siguiendo las instrucciones del fabricante para obtener una solución estándar con una concentración de 50 unidades de endotoxina (UE) por ml. Esta solución estándar se trató mediante filtración, de manera análoga a lo descrito para las muestras de leche, y se utilizó para preparar diluciones en base diez de manera seriada. Así, para la obtención del patrón primario certificado con una concentración de 50 UE/ml se reconstituyó el vial de endotoxina con la cantidad exacta de agua libre de endotoxina indicada por el fabricante, agitando vigorosamente durante 5 minutos en vórtex para conseguir su disolución y homogenización. Tras el paso a través del filtro de PVDF con un tamaño de poro de 0,45 μm , este patrón se empleó para preparar nuevas diluciones con concentraciones de 5, 0,5 y 0,05 UE/ml, necesarias para la preparación de la curva patrón.

Para ello, en tres tubos libres de endotoxinas y bien identificados se añadieron 900 μl de agua ultrapura libre de endotoxinas. Seguidamente, se dispensaron en el primero de los tubos 100 μl del vial de endotoxina de concentración 50 EU/ml, se agitó en vórtex durante 1 minuto y se obtuvo el patrón con una concentración de endotoxina de 5 EU/ml. Nuevamente, transfiriendo 100 μl del patrón con 5 UE/ml al segundo tubo y agitando de forma similar en vórtex se obtuvo el patrón con 0,5 EU/ml. Finalmente, transfiriendo 100 μl del patrón con 0,5 EU/ml al tercero de los tubos con 900 μl de agua se obtuvo el patrón con 0,05 EU/ml.

Como control negativo y quinto punto de la curva patrón del método se incluyó agua libre de endotoxinas, también denominado blanco.

4.1.2.3- Validación interna del ensayo

De acuerdo a las instrucciones proporcionadas por el fabricante, es necesario llevar a cabo una validación del test y de los reactivos empleados, particularmente cuando se emplea algún reactivo que provenga de un nuevo proveedor o que forme parte de un nuevo lote. Esta validación tiene por objeto comprobar el buen estado de todos los viales, de los reactivos y del agua libre de endotoxinas empleados en la determinación.

Para ello se debe preparar, como acabamos de describir, la curva patrón a partir del estándar de endotoxina, con cuatro concentraciones, así como una muestra blanco. Esta serie de diluciones debe ser procesada en el test de determinación de actividad de endotoxina por quintuplicado, procediendo tal y como se indica a continuación en el apartado 4.1.2.4 que describe la realización del test.

Para que este proceso de validación sea aceptado, todos los puntos de la recta, incluido el blanco, deben cumplir con los parámetros descritos por el fabricante; el propio software del lector realiza la evaluación y definirá como aceptables o no aceptables los resultados (Figura 13). Esta etapa es necesario ejecutarla antes de proceder a la realización de análisis de rutina sobre muestras de diferente naturaleza.

Validación interna del Ensayo.plt

File Name:	804023112902.plt	Lab Name:			
Assay Date:	29/11/2023 16:46:05	Onset OD:	0,1		
Collection Mode:	Kinetic Turbidimetric	Wavelength Filter:	340		
Type of Curve Fit:	Linear Regression, Avg. Replicates	Reader:	BioTek		
Polynomial Order:	N/A	Temperature:	36,9 : 36,9 °C		
Serial Number:	208040	Operator:	Pablo Flórez		
<u>Standard Set</u>	<u>Range</u>	<u>R-Value</u>	<u>Acceptable</u>	<u>Slope</u>	<u>Y-Intercept</u>
STD1:STD4	50 : 0,05	-1,0000	YES	-0,1511	3,0168

Well Lavout

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STD1 STD1 50.0000	STD1 STD1 50.0000	STD1 STD1 50.0000	STD1 STD1 50.0000	STD1 STD1 50.0000							
B	STD2 STD2 5.0000	STD2 STD2 5.0000	STD2 STD2 5.0000	STD2 STD2 5.0000	STD2 STD2 5.0000							
C	STD3 STD3 0.5000	STD3 STD3 0.5000	STD3 STD3 0.5000	STD3 STD3 0.5000	STD3 STD3 0.5000							
D	STD4 STD4 0.0500	STD4 STD4 0.0500	STD4 STD4 0.0500	STD4 STD4 0.0500	STD4 STD4 0.0500							
E	AGUAI CTRL1	AGUAI CTRL1	AGUAI CTRL1	AGUAI CTRL1	AGUAI CTRL1							
F	AGUA CEBADA SPK2	AGUA CEBADA SPK2	AGUA CEBADA SPK2	AGUA CEBADA SPK2	AGUA CEBADA SPK2							
G												
H												

Figura 13: Validación interna del test turbidimétrico cinético para la determinación de la actividad de endotoxina siendo STD1: patrón de endotoxina de 50 unidades de endotoxina (UE)/ml, STD2: patrón de endotoxina de 5 UE/ml, STD3 patrón de endotoxina de 0,5 UE/ml, STD4 patrón de endotoxina de 0,05 UE/ml, CTRL1 agua libre de endotoxinas, SPK2 agua libre de endotoxina cebado con patrón de endotoxina con concentración final de 0,5 UE/ml.

4.1.2.4- Ensayo turbidimétrico cinético LAL

Para la determinación rutinaria de endotoxinas en leche empleando la técnica puesta a punto en este trabajo, incluimos en cada placa una curva patrón constituida por cuatro puntos o concentraciones (50, 5, 0,5 y 0,05 EU/ml), además del blanco. En contraposición, el método oficial para detección de endotoxinas en emplea, tan sólo, una recta patrón constituida por tres puntos. Además, todos los puntos de la curva patrón, incluido el blanco, se procesaron por duplicado en cada placa. Tanto el patrón de endotoxinas primario como las diluciones correspondientes se realizan de acuerdo al apartado 4.1.2.2 (Preparación de la recta de calibración).

Las muestras problema se procesaron de forma rutinaria a las diluciones 1:500 y 1:1.000, como se ha indicado anteriormente, y por duplicado.

La disposición de los puntos de la curva patrón y de las muestras problema en los pocillos de la placa se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante, tal y como se muestra en la Figura 14.

		Well Lavout											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STD1	STD1	SPK37	SPK37	SPK64	SPK64	SPK74	SPK74	SPK82	SPK82	SPK90	SPK90	
	50.0000	50.0000	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	
B	STD2	STD2	SPL41	SPL41	SPL66	SPL66	SPL76	SPL76	SPL84	SPL84	SPL92	SPL92	
	5.0000	5.0000	M2a	M2b	M4a	M4b	M6a	M6b	M7a	M7b	M9a	M9b	
C	STD3	STD3	SPK41	SPK41	SPK66	SPK66	SPK76	SPK76	SPK84	SPK84	SPK92	SPK92	
	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	
D	STD4	STD4	SPL44	SPL44	SPL68	SPL68	SPL78	SPL78	SPL86	SPL86	SPL94	SPL94	
	0.0500	0.0500	M2a	M2b	M4a	M4b	M6a	M6b	M8a	M8b	M10a	M10b	
E	CTRL1	CTRL1	SPK44	SPK44	SPK68	SPK68	SPK78	SPK78	SPK86	SPK86	SPK94	SPK94	
	CTRL1	CTRL1	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	
F	SPL2	SPL2	SPL56	SPL56	SPL72	SPL72	SPL80	SPL80	SPL88	SPL88	SPL96	SPL96	
	M1a	M1b	M3a	M3b	M5b	M5b	M6a	M6b	M8a	M8b	M10a	M10b	
G	SPK2	SPK2	SPK56	SPK56	SPK72	SPK72	SPK80	SPK80	SPK88	SPK88	SPK96	SPK96	
	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	
H	SPL37	SPL37	SPL64	SPL64	SPL74	SPL74	SPL82	SPL82	SPL90	SPL90			
	M1a	M1b	M3a	M3b	M5a	M5b	M7a	M7b	M9a	M9b			
	1000	1000	1000	1000	1000	1000	500	500	500	500			

Figura 14: Diseño de una placa de 96 pocillos para el ensayo turbidimétrico cinético de *Limulus ameobocite lysate* (LAL) optimizado para la matriz leche, siendo STD los patrones de las concentraciones de 50 (STD 1), 5 (STD 2), 0,5 (STD 3) y 0,05 (STD 4) EU/ml, CTRL el blanco (agua libre de endotoxinas), M las muestras problema (M1, M2, M3...), siendo Mx500a la réplica 1 de la dilución 1:500 y Mx500b la réplica 2 de la dilución 1:500 y Mx1000a y Mx1000b las dos réplicas de dilución 1:1.000, SPL la muestra sin cebar y SPK la muestra cebada (spike).

Además, en todos los ensayos realizados, se incluyó para cada muestra un control interno o “spike” (SPK), obtenido mediante la adición o cebado de la muestra con una concentración conocida del patrón de endotoxina. Esto permite, al cuantificar la endotoxina presente en la muestra cebada o muestra SPK, determinar para forma individual para cada muestra el porcentaje de recuperación (con respecto a la concentración de endotoxina adicionada) y detectar la presencia de sustancias que puedan enmascarar la determinación. Cada muestra cebada deberá alcanzar un mínimo de detección o mínimo de recuperación para que la determinación realizada en los pocillos

sin adición de endotoxina pueda ser considerada válida. La concentración de endotoxina adicionada en el pocillo de esta muestra cebada o SPK fue de 0,5 EU/ml. Para ello, se añadieron 10 µl del tubo que contenía el estándar de endotoxina a una concentración de 5 EU/ml a un pocillo que contenía la dilución 1:500 o 1:1.000 de cada una de las muestras problema (realizando una dilución 1:10).

El programa de lectura de las placas calcula de forma automática el porcentaje de recuperación para las muestras cebadas, debiendo alcanzarse un valor entre el 50 y el 200 %, según las especificaciones del fabricante. De no cumplirse este parámetro, la lectura proporcionada por la muestra problema no será válida. Así, se debe prestar atención al valor proporcionado por el programa para el pocillo con muestra cebada y sin cebar con el fin de determinar si existe algún problema en la recuperación y, por lo tanto, descartar la medición efectuada en esa muestra. Al igual que los patrones, el blanco y las muestras problema, también estos controles cebados o SPK se realizaron por duplicado.

Tanto para los patrones como para el blanco, las muestras problema y sus controles cebados se dispensó un volumen de 100 µl en cada pocillo de la placa que fue suplementado con 100 µl del lisado de amebocitos. La dispensación de este lisado de amebocitos se realizó en el menor tiempo posible, colocando de forma inmediata la placa en el lector en el que se realiza la incubación e iniciando las lecturas repetidas de la turbidez (Figura 15).

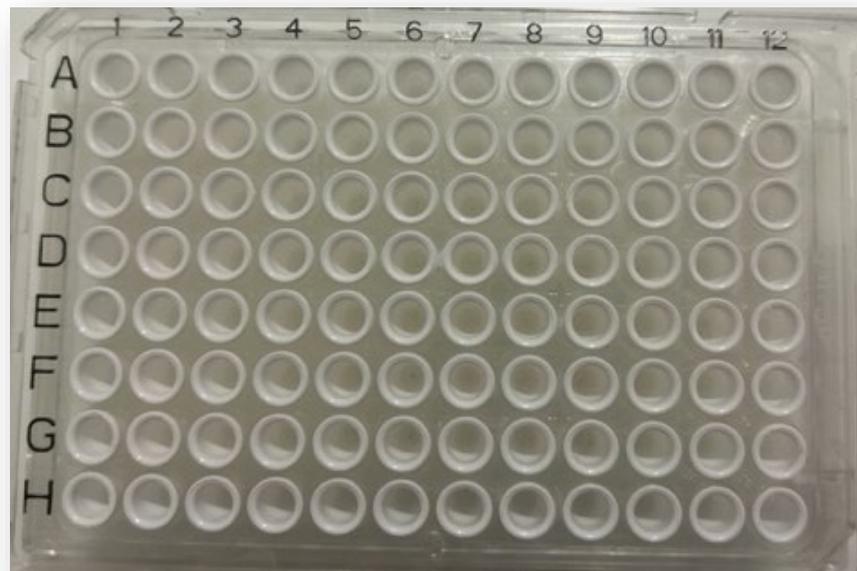


Figura 15: Placa y lector empleados en el ensayo turbidimétrico cinético para la determinación de la concentración de endotoxinas en muestras de leche.

Una vez completada la cinética del ensayo, el propio software del equipo realiza los cálculos y expresa el resultado como la media de las dos réplicas para cada muestra. Si el coeficiente de variación entre réplicas supera el 10 %, el propio software indicará que la determinación no es válida. En el caso de que el valor de alguna de las muestras cebadas supere el valor asignado por el fabricante, se marca como invalido el resultado, siendo necesaria la repetición de esa muestra y de su réplica junto con su correspondiente muestra cebada o SPK.

4.1.2.5- Controles de calidad

Como controles de calidad se incluyeron en todas las placas de este procedimiento controles negativos, realizados con agua libre de endotoxinas, las réplicas de cada una de las muestras problema, así como los controles cebados o SPK. Si cualquiera de estas muestras genera resultados que no se encuentran dentro de lo admitido, es necesario repetir el análisis.

En el caso de los controles realizados con agua libre de endotoxina el valor obtenido debe ser inferior a 0,05 UE/ml.

En el caso de las réplicas y de las muestras cebadas (SPK), el coeficiente de variación entre sus resultados debe ser inferior al 10 %.

Todos estos valores son calculados directamente por el equipo al realizar la lectura y son incluidos en el informe final que se genera, tal y como se muestra en la Figura 16.

Cuando no se cumplen los requisitos establecidos, es necesario repetir la placa completa o la muestra problema en particular. En concreto, se invalidará por completo la placa cuando sea el blanco el que no cumpla con las expectativas, puesto que el blanco se ha realizado con el agua libre de endotoxinas con la que se realizan también las diluciones de las muestras y de los estándares. Por el contrario, si el problema está en una elevada desviación de las réplicas de una muestra o en el porcentaje de recuperación de una muestra en particular, tan solo se invalidará el resultado de la muestra particular.

File Name:	S04023112900.plt	Lab Name:			
Assay Date:	29/11/2022 13:32:22	Onset OD:	0,1		
Collection Mode:	Kinetic Turbidimetric	Wavelength Filter:	340		
Type of Curve Fit:	Linear Regression, Avg. Replicates	Reader:	BioTek		
Polynomial Order:	N/A	Temperature:	36,9 : 37,0 °C		
Serial Number:	208040	Operator:	Pablo Flórez		
<u>Standard Set</u>	<u>Range</u>	<u>R-Value</u>	<u>Acceptable</u>	<u>Slope</u>	<u>Y-Intercept</u>
STD1:STD4	50 : 0,05	-0,9998	YES	-0,2498	2,9553

Standards and Controls Information

Ident.	Expected Concentration	Well Layout	Reaction Time	Mean Reaction Time	Standard Deviation	CV%	CV < 10%	Calculated Value
STD1	50 EU/mL	A1	330,0	341,0	10,96	3,21	VALID	>49,1920
		A2	351,9				VALID	
STD2	5 EU/mL	B1	573,8	593,7	19,91	3,35	VALID	5,3432
		B2	613,6				VALID	
STD3	0,5 EU/mL	C1	1096,2	1095,6	0,58	0,05	VALID	0,4598
		C2	1095,0				VALID	
STD4	0,05 EU/mL	D1	1876,9	1890,9	14,06	0,74	VALID	<0,0517
		D2	1905,0				VALID	
CTRL1		E1	>1950,0	>1950,0	0,00	0,00	VALID	<0,0500
		E2	>1950,0				VALID	

Products

Group	Name	Lot Number	Reaction Time	CV%	CV < 10%	Endotoxin Value	Spike Rcvy %
SPL97	255353	N/A	1621,4; 1588,5	1,02	VALID	0,0997 EU/mL	
SPK97			1037,5; 991,6	2,26	VALID	0,6254 EU/mL	105

Figura 16: Informe de resultados donde se muestra la recta patrón, así como los controles de calidad. Aparecen los coeficientes de variación (CV) entre réplicas de muestras y patrones, así como entre muestras cebadas o spike (SPK). Se incluye un ejemplo de porcentaje de recuperación del 105% en la muestra SPK.

4.1.3- Validación del ensayo LAL en la matriz leche

La validación de un método analítico comprende la estimación de parámetros estadísticos que permiten evaluar los resultados del análisis en términos de exactitud y de precisión. Para ello comparamos los resultados obtenidos con los patrones de referencia, así como con muestras de la matriz de estudio cebadas y determinamos la precisión, la exactitud y la incertidumbre o sesgo de medida de la técnica evaluada y para la matriz concreta de trabajo.

Además, en este proceso de estandarización de la técnica es necesario evaluar los resultados obtenidos en las mediciones efectuadas por analistas diferentes y en diferentes periodos de tiempo, determinando los valores de repetibilidad y reproducibilidad respectivamente.

4.1.3.1- Conceptos y términos de validación

Para realizar estas estimaciones los laboratorios se basan en las indicaciones establecidas por las normas de la Organización Internacional de Normalización (del inglés *International Organization for Standardization*) ISO 5725-1:1994, “Cálculo de exactitud (veracidad y precisión) de métodos de medición y resultados” (ISO, 5725) e ISO 19036:2019, “Microbiología de la cadena alimentaria. Estimación de la incertidumbre de medición para determinaciones cuantitativas, como guías para los estudios estadísticos y evaluación de las técnicas de ensayo” (ISO, 19036).

A continuación, y con el fin de poder entender e interpretar adecuadamente los procedimientos de validación de los métodos de medición, se describen los principales términos y definiciones establecidos en estas normas.

- Valor observado: valor de una característica obtenido como resultado de una observación individual.
- Resultado del ensayo: valor de una característica obtenido tras la realización de un método de ensayo específico. El resultado del ensayo puede ser un resultado calculado tras la observación de varios valores y se debe especificar si este resultado es la consecuencia de una o de más observaciones y debería aportar, en su caso, como resultado el valor medio u otra función (mediana o

desviación estándar). Además, se debe especificar si se han aplicado correcciones normalizativas, como por ejemplo correcciones de volúmenes de gases a temperatura y presión normalizadas.

- Valor de referencia aceptado: valor que sirve como referencia consensuada para la comparación y que se obtiene a partir de:
 - a) un valor teórico o establecido, basado en principios científicos,
 - b) un valor asignado o certificado, basado en trabajos experimentales de alguna organización nacional o internacional,
 - c) un valor certificado o consensuado, basado en trabajos de colaboración experimental bajo los auspicios de algún grupo científico o técnico,
 - d) cuando no se trata de ninguno de los casos anteriores, la esperanza de la magnitud (medible), como por ejemplo la media de una población especificada de medidas.
- Exactitud: grado de concordancia existente entre el resultado del ensayo y un valor aceptado como referencia o proximidad entre un valor medido y el valor verdadero del mensurando. Este término, aplicado a un conjunto de resultados, implica una combinación de componentes o errores aleatorios y un componente de error sistemático o sesgo.
- Veracidad: grado de concordancia entre el valor medio obtenido de una serie de resultados y un valor aceptado como referencia. Esta medida se expresa, usualmente, en términos de sesgo. Aunque no se recomienda, en ocasiones se denomina como exactitud de la media.
- Sesgo: diferencia entre la esperanza matemática o valor esperado de la magnitud y el valor de referencia aceptado. Este sesgo es el error sistemático total, en contraposición al error aleatorio. Pueden existir uno o más componentes de error sistemático que contribuyen de forma simultánea al sesgo. A mayor diferencia sistemática respecto al valor aceptado de referencia, mayor valor de sesgo.

- Sesgo del laboratorio: la diferencia entre la esperanza matemática o valor esperado de los resultados del ensayo de un laboratorio particular y un valor referencia aceptado.
- Sesgo del método de medición: diferencia entre la esperanza matemática de los resultados de ensayo obtenidos por todos los laboratorios que utilizan el mismo método y un valor aceptado como referencia.
- Componente del sesgo del laboratorio: diferencia entre el sesgo del laboratorio y el sesgo del método de medición. La componente del sesgo del laboratorio es específica para un laboratorio dado y para las condiciones de medición dentro del laboratorio y también puede variar para diferentes niveles del ensayo.
- Precisión: grado de concordancia existente entre los resultados independientes de un ensayo, obtenidos en condiciones estipuladas. La precisión depende únicamente de la distribución de los errores aleatorios y no está relacionada con el valor verdadero o especificado. Habitualmente se expresa en términos de falta de precisión, calculándose a partir de la desviación típica o desviación estándar de los resultados del ensayo. A mayor desviación típica, menor precisión. Al hablar de resultados de ensayo independientes nos referimos a resultados obtenidos sin que exista influencia de un resultado previo sobre el mismo objeto o similar de ensayo. La expresión cuantitativa de la precisión depende en forma crítica de las condiciones estipuladas. Las condiciones de repetibilidad y reproducibilidad son conjuntos particulares de condiciones extremas.
- Repetibilidad: precisión bajo condiciones de repetibilidad.
- Condiciones de repetibilidad: condiciones bajo las que se obtienen resultados independientes, con el mismo método, sobre muestras idénticas, en el mismo laboratorio, por el mismo operador y utilizando los mismos equipos de medición, durante un corto intervalo de tiempo.
- Desviación típica o desviación estándar de repetibilidad: desviación típica o desviación estándar de los resultados del ensayo obtenida bajo condiciones de repetibilidad. Es una medida de la dispersión de la función de distribución del

ensayo bajo condiciones de repetibilidad. Otras medidas de dispersión que pueden emplearse bajo condiciones de repetibilidad son la varianza de repetibilidad y el coeficiente de variación de repetibilidad.

- Límite de repetibilidad: valor por debajo del cual se sitúa, con una probabilidad del 95 %, el valor absoluto de la diferencia entre dos resultados de ensayo obtenidos bajo condiciones de repetibilidad.
- Reproducibilidad: precisión bajo condiciones de reproducibilidad.
- Condiciones de reproducibilidad: condiciones bajo las cuales los resultados se obtienen con el mismo método, sobre muestras idénticas, en laboratorios diferentes, con operadores distintos y utilizando equipos diferentes.
- Desviación típica o desviación estándar de reproducibilidad: la desviación típica o desviación estándar de los resultados del ensayo obtenidos bajo condiciones de reproducibilidad. Se trata de una medida de dispersión de la función de distribución de los resultados del ensayo obtenido bajo condiciones de reproducibilidad. Otras medidas de dispersión de los resultados del ensayo bajo condiciones de reproducibilidad incluyen la varianza de la reproducibilidad y el coeficiente de variación de la reproducibilidad.
- Límite de reproducibilidad: valor por debajo del cual se sitúa, con una probabilidad de 95 %, el valor absoluto de la diferencia entre dos resultados de ensayo obtenidos bajo condiciones de reproducibilidad. Suele representarse con la letra mayúscula R.
- Valor atípico: elemento de un conjunto de valores que es incoherente con los otros elementos de dicho conjunto. La norma NC-ISO 5725-2 especifica las décimas estadísticas y el nivel de significación que hay que utilizar para identificar los valores atípicos en las determinaciones de veracidad y precisión.

Tomando como referencia estos términos y definiciones aportados de las normas indicadas (ISO, 1994; ISO, 2019), podemos afirmar que un experimento de exactitud es un ensayo práctico sobre la adecuación de un método de medición normalizado que tiene como objetivo demostrar que el protocolo del ensayo no presenta diferencias significativas ni para el mismo usuario y laboratorio ni entre usuarios diferentes; diferencias marcadas en las varianzas entre las réplicas o entre los valores medios obtenidos por distintos usuarios/laboratorios son indicativas de que el método de medición normalizado no está suficientemente desarrollado y optimizado y que debe ser mejorado.

Para estimar la exactitud (veracidad y precisión) de un método de medición resulta de utilidad suponer que cada resultado de ensayo, y , es la suma de tres componentes:

$$y = m + B + e$$

donde, para el material particular ensayado:

m es la media general o esperanza

B es la componente del sesgo debida al laboratorio, bajo condiciones de repetibilidad

e es el error aleatorio que tiene lugar en cada medición, bajo condiciones de repetibilidad

En nuestro caso, teniendo en cuenta que estamos analizando la diferencia entre los resultados obtenidos utilizando el mismo método de medición, el sesgo de medición carecerá de influencia y puede ignorarse.

En lo que respecta al término B, sesgo de laboratorio, este valor se considera como constante durante cualquier serie de ensayos ejecutados en condiciones de repetibilidad, pero puede diferir cuando los ensayos se realizan bajo otras condiciones. Cuando se comparan los resultados de ensayo entre dos analistas (siempre los mismos) es necesario determinar el sesgo relativo existente entre ambos, a partir de sus valores individuales de sesgo, determinados a partir de un experimento de exactitud. La varianza de B se denomina varianza inter-analistas y se expresa como:

$$\text{Var (B)} = \sigma^2 L$$

donde:

$\sigma^2 L$ incluye la variabilidad entre operadores y entre equipos de medición

De manera general B puede considerarse como la suma de las componentes aleatoria y sistemática de un ensayo.

Finalmente, el término e representa el error aleatorio asociado a cada resultado del ensayo y a los procedimientos de análisis, asumiéndose que la distribución de esta variable es aproximadamente normal, aunque en la práctica se apliquen a la mayor parte de las distribuciones siempre que éstas sean unimodales.

4.1.3.2- Ensayo para determinar la exactitud, incertidumbre y precisión

Para la validación de la técnica turbidimétrica cinética LAL sobre la matriz leche empleamos los patrones de referencia, así como muestras cebadas con material de referencia (leche suplementada con patrón de endotoxinas), respetando la definición de condiciones de repetibilidad que establece que las mediciones tendrán que ser realizadas sobre muestras idénticas.

En primer lugar, se determinó la exactitud, precisión, incertidumbre y coeficiente de variación de los patrones correspondientes a 50, 5, 0,5 y 0,05 EU/ml, preparados como se ha indicado anteriormente (apartado 4.1.2.2) a partir de diluciones seriadas del patrón comercial de 50 EU/ml. Todos estos patrones fueron filtrados de forma similar al tratamiento realizado en las muestras de leche (apartado 4.1.2.1).

Seguidamente y con el fin de conocer la repetibilidad del método y el coeficiente de variación se realizaron una serie de mediciones de muestras, con valores comprendidos dentro del rango alto, medio y bajo, por parte de dos analistas diferentes. Finalmente, la reproducibilidad del método se determinó midiendo una serie de muestras replicadas a lo largo del tiempo y por dos analistas diferentes.

4.2- DIAGNÓSTICO DE MAMITIS EN MUESTRAS DE LECHE

Las muestras de leche utilizadas para la validación de la técnica de determinación de endotoxinas fueron, a su vez, procesadas para el diagnóstico rutinario de mastitis mediante el aislamiento e identificación del patógeno causante de la mastitis y mediante el RCS. Ambas técnicas fueron empleadas tanto en las muestras de leche procedentes de animales con mastitis clínica como en las muestras de tanque de leche.

4.2.1- Cultivo microbiológico de las muestras de leche

Para la detección de bacterias Gram negativas en muestras de leche se utilizaron dos métodos; por un lado, un método de aislamiento general a partir de muestras de leche recomendado por el *National Mastitis Council*, basado en el empleo de agar sangre (Becton-Dickson Microbiology), y que permite el aislamiento tanto de bacterias Gram negativas como de Gram positivas; paralelamente, se empleó un método de recuento por siembra en placa de agar cromogénico que permite aislar y cuantificar, de forma selectiva, coliformes totales y *E. coli* mediante la utilización de agar para coliformes Chromocult® (Brilliance *E. coli*/coliform chromogenic select agar, Millipore), permitiendo la detección selectiva de bacterias de los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter*.

Todas las manipulaciones para el cultivo microbiológico de las muestras de leche se llevaron a cabo en cabina de seguridad biológica.

4.2.1.1- Método de aislamiento general

Para cada muestra se sembraron 100 µl de leche cruda en sábana o césped sobre la superficie de una placa de agar sangre utilizando un asa de Drigalski desechable. Posteriormente, las placas se invirtieron y se incubaron en estufa a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas \pm 2 horas. Para la lectura se obtuvo tanto el número de colonias como su identificación primaria basada en la morfología de la colonia, la morfología de la célula bacteriana (cocos, bacilos o cocobacilos) y sus características tintoriales (Gram positivas o Gram negativas), el tipo de hemólisis y las pruebas bioquímicas de la oxidasa y la catalasa realizadas como se describe a continuación.

- Prueba de la catalasa:

La catalasa es una enzima que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. La prueba se utiliza para comprobar la presencia de la enzima catalasa que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen el citocromo oxidasa con excepción de algunos géneros como *Streptococcus*. Para esta determinación se utilizó el método del portaobjetos a temperatura ambiente; en un portaobjetos se depositaron una o dos gotas de agua oxigenada al 30 %, poniendo en contacto con ella una alícuota de cada colonia de los microorganismos a estudiar con el asa de siembra. La formación inmediata de una efervescencia rápida con desprendimiento de burbujas revela la presencia de la enzima y es, por tanto, resultado positivo.

- Prueba de la oxidasa

Esta prueba sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromo oxidasa. Los citocromos son enzimas que forman parte de la cadena de transporte de electrones en la respiración aeróbica, transfiriendo electrones al oxígeno, con la formación de agua. Por lo general, el sistema citocromo oxidasa sólo se encuentra en los organismos aerobios, algunos anaerobios facultativos y, excepcionalmente, en algún microaerófilo (como por ejemplo *Vibrio fetus*), pero los anaerobios estrictos carecen de actividad oxidasa. Asimismo, la presencia de oxidasa va ligada a la producción de catalasa, ya que ésta degrada el peróxido de hidrógeno que se produce como consecuencia de la reducción del oxígeno y cuya acumulación es tóxica.

La prueba de la oxidasa se usa sobre todo para identificar todas las especies del género *Neisseria*, positivas, y para diferenciar bacterias del género *Pseudomonas* de los otros géneros oxidasa negativos de las enterobacterias.

El reactivo de la oxidasa más recomendado es la solución acuosa al 1 % de diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina o reactivo de Kovacs que tiñe las colonias positivas de un color lavanda que vira gradualmente a púrpura-negruzco intenso.

Se utilizó el método indirecto sobre papel, colocando un trozo de papel de filtro de 3 x 3 cm, aproximadamente, en la superficie de una placa de Petri y agregándole 2-3 gotas del reactivo de Kovacs (CondaLab) en el centro para, inmediatamente, extender con el asa de siembra cada una de las colonias en estudio. La reacción de color debe producirse a los 5-10 segundos para que la muestra sea considerada positiva (Figura 17).

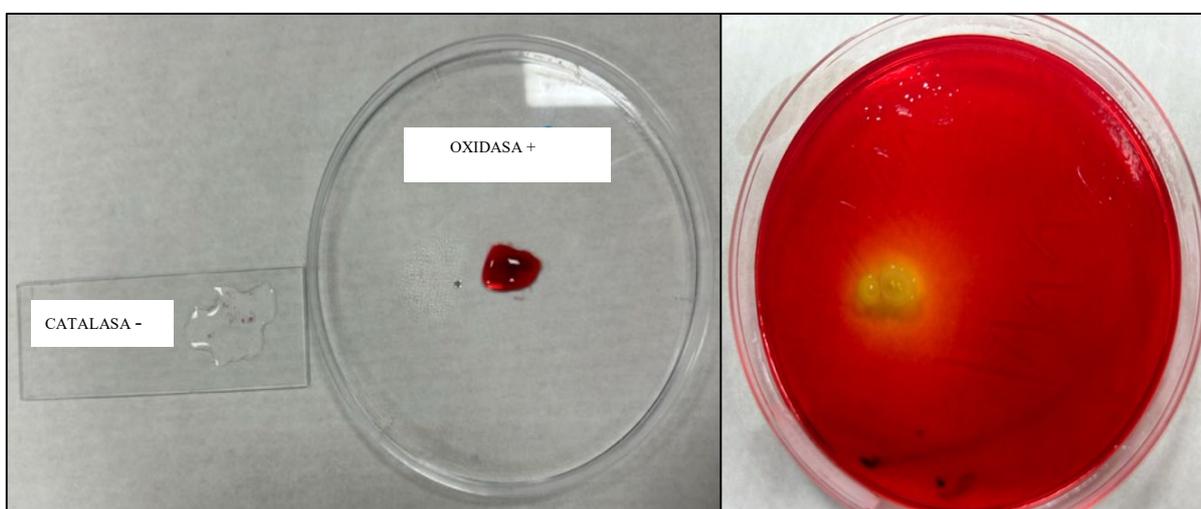


Figura 17: Test de catalasa y oxidasa para la identificación microbiana sobre colonias recuperadas en el cultivo microbiológico de muestras de leche bovina.

4.2.1.2- Método de aislamiento selectivo en agar cromogénico

En el método de aislamiento selectivo en agar cromogénico, para cada muestra de leche se realizaron diluciones decimales seriadas, hasta una dilución 10^{-9} , y utilizando agua de peptona tamponada (CondaLab). Por duplicado, se realizó la siembra depositando, con una micropipeta estéril, 1 ml de cada una de las diluciones sobre la superficie de una placa de Petri de 90 mm de diámetro estéril. De forma inmediata se vertieron, sobre cada una de las placas, 15 ml del agar selectivo para coliformes cromogénico atemperado a $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, mezclando este medio fundido con el inóculo,

agitando suavemente mediante movimientos circulares y de traslación, sin dejar de apoyar las placas sobre la mesa de trabajo. Posteriormente se dejó solidificar el medio dentro de la cabina de seguridad biológica durante unos minutos y, una vez solidificadas, las placas se invirtieron y se incubaron en estufa a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24 \text{ horas} \pm 2 \text{ horas}$.

La figura 18 muestra un esquema del procedimiento realizado.

Transcurrido el tiempo de incubación se procedió al recuento de las colonias; para ello se escogieron aquellas placas de dilución con un número de colonias entre 90 y 140 y, a partir de ellas, se seleccionaron las colonias que presentaron un color azul o azul violáceo fueron identificadas como *E. coli*, mientras que las colonias que presentaron un color rosa asalmonado o rojo fueron identificadas como bacterias coliformes totales.

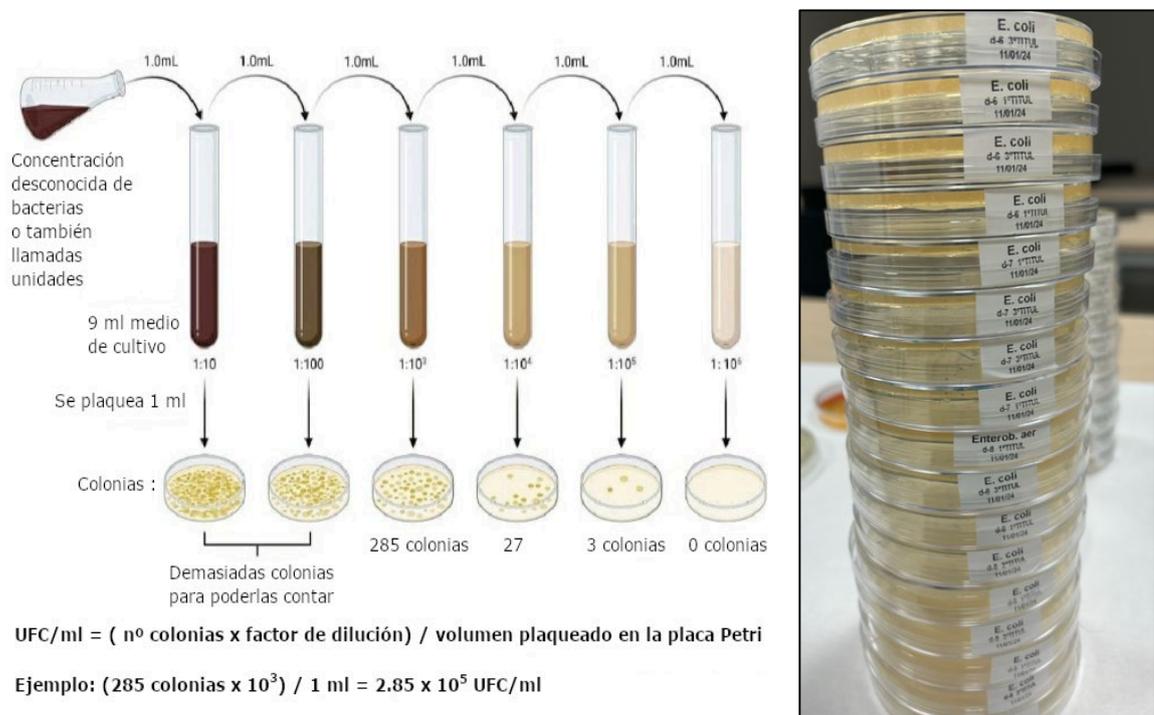


Figura 18: Método de aislamiento selectivo en agar cromogénico: diluciones seriadas y siembra en profundidad para la realización del recuento microbiano en cada muestra de leche investigada.

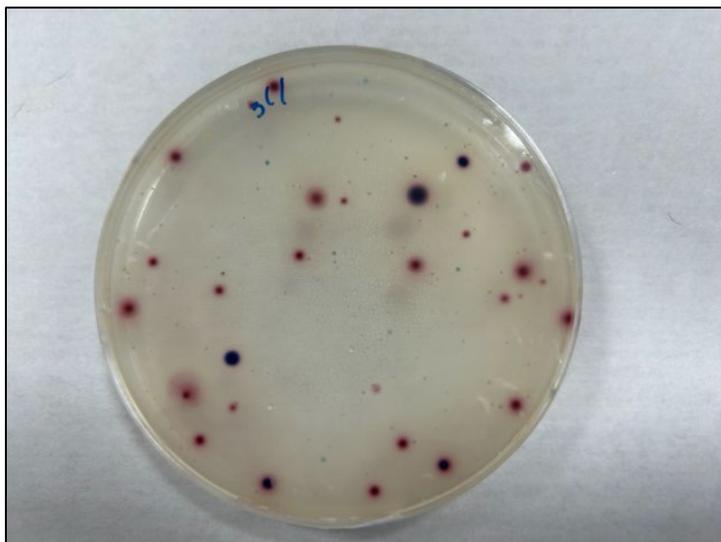


Figura 19: Crecimiento bacteriano en agar cromogénico. Las colonias de *Escherichia coli* se aprecian en color azul, mientras que las de otros coliformes aparecen en color rosa.

4.2.1.3- Identificación molecular

Todas las colonias diferentes aisladas de las muestras de leche fueron identificadas, posteriormente, mediante técnicas moleculares, amplificando un fragmento del rADN 16S bacteriano mediante reacción en cadena de la polimerasa o *polymerase chain reaction* (PCR) convencional y visualizando la banda correspondiente mediante técnicas de electroforesis en gel de agarosa.

Para la obtención del ADN bacteriano de las colonias recuperadas de las placas, se tomó una pequeña cantidad del crecimiento bacteriano con un asa de siembra, resuspendiéndolo en 10 μ l de NaOH 0,02 M en un tubo Eppendorf e incubando a 100°C durante 2 minutos en un termobloque (Thermo Scientific). Como control negativo de reacción se incluyó una alícuota de 10 μ l de NaOH 0,02 M que sufrió idéntico proceso al de las muestras.

El material obtenido se empleó para llevar a cabo la reacción de PCR, utilizando dos cebadores que amplifican un fragmento de unos 350 pares de bases o *base pair* (pb) del rADN 16S bacteriano previamente descritos (Janda y Abbott, 2007; Sambrook y Russel, 2001). La secuencia de esta pareja de cebadores fue AGAGTTTGATCCTGGCTCAG para el cebador *forward* y AAGGAGGTGATCCANCCRCA para el reverso (Tabla 1). Los cebadores fueron sintetizados por Thermo Fisher, mientras que el kit empleado para esta PCR fue OptiTac

PCR MasterMix (EURx) que incluye ADN polimerasa, cloruro de magnesio y desoxirribonucleótidos (dNTPs).

El perfil térmico de PCR fue de 35 ciclos de amplificación con una desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, anillamiento a 55°C durante 30 segundos y elongación a 72°C durante 30 segundos.

Para la detección del fragmento amplificado se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa (Sigma-Aldrich) al 1 % suplementado con RedSafe (iNtRON BIOTECHNOLOGY) en la proporción marcada por el fabricante, utilizando como tampón Tris-acetato-EDTA (Thermo Scientific) y realizando la electroforesis a 100 V durante 75 minutos.

La detección de una banda con un peso aproximado de 350 pb indica que se ha producido la amplificación del fragmento del genoma bacteriano flanqueado por los cebadores empleados (Figura 20). Para la identificación se llevó a cabo la secuenciación del fragmento amplificado.

Cebadores	Secuencia
Forward: 27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
Reverse: 1522R	AAGGAGGTGATCCANCCRCA

Tabla 1: Cebadores empleados para la identificación bacteriana mediante la amplificación de un fragmento de 350 pb del gen 16S ribosomal en los aislados bacterianos recuperados de casos de mamitis clínica.

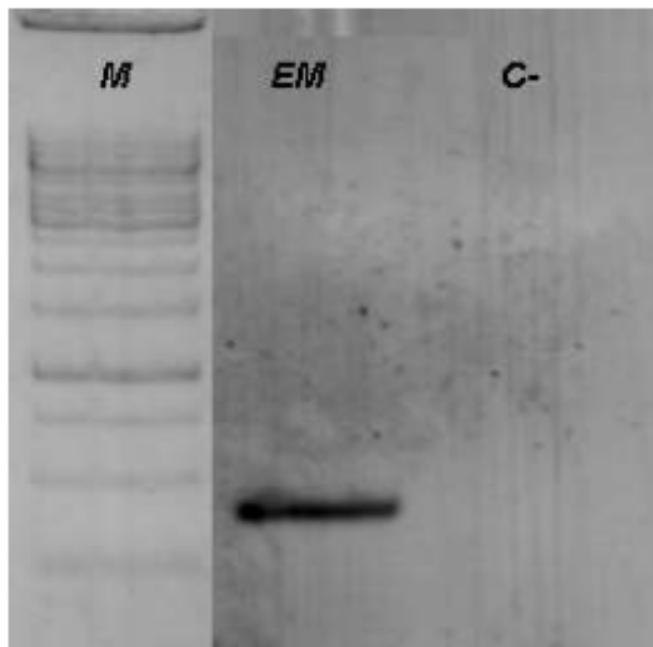


Figura 20: Electroforesis en gel de agarosa al 1 % con los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). M: marcador de peso molecular; C-: control negativo; EM: muestra problema.

Finalmente, para la identificación, los fragmentos amplificados fueron secuenciados. Para ello, con la ayuda de un bisturí, se recortaron las bandas del gel de agarosa, se introdujeron en un microtubo estéril y se remitieron a un servicio de secuenciación externo, CENIT SUPPORT SYSTEMS (Salamanca), empresa que se encargó de realizar la secuenciación e identificación de los fragmentos amplificados. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias depositadas en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando el algoritmo Megablast (highly similar sequences) frente a la base de datos no redundante (nr/nt). Se seleccionaron los resultados con un mayor porcentaje de similitud y en las bacterias en que sólo se obtuvo la identificación a nivel de género, se determinó la especie que alcanzó la mayor homología.

4.2.2- Recuento de células somáticas (RCS)

El RCS determina la concentración de células por unidad de volumen en las muestras de leche, incluyendo diferentes tipos de leucocitos y las células epiteliales. Desde el punto de vista clínico, el RCS es ampliamente reconocido como método para monitorizar el estado de salud de la glándula mamaria, existiendo una relación directa entre este RCS, el grado de infección y la disminución de la producción láctea.

Aunque existen diferentes métodos para llevar a cabo el RCS, hoy en día se emplean, de forma habitual, los métodos automáticos de recuento.

Las muestras de leche utilizadas en el presente estudio, después de su utilización para el análisis microbiológico, fueron sometidas al ensayo del RCS utilizando un equipo automático portátil, DeLaval cell Counter DCC (equipo cedido por Laboratorios Analíticos Agrovet S.L.). Este equipo es un contador de células óptico y portátil que utiliza un cartucho o casete de un solo uso para el procesamiento de la muestra, con reactivos que reaccionan con el núcleo de las células somáticas una vez depositada la muestra de leche en el cartucho y que emiten señales fluorescentes que son detectadas, registrándose para determinar el número de células somáticas presentes en esa muestra (Figuras 21 y 22).

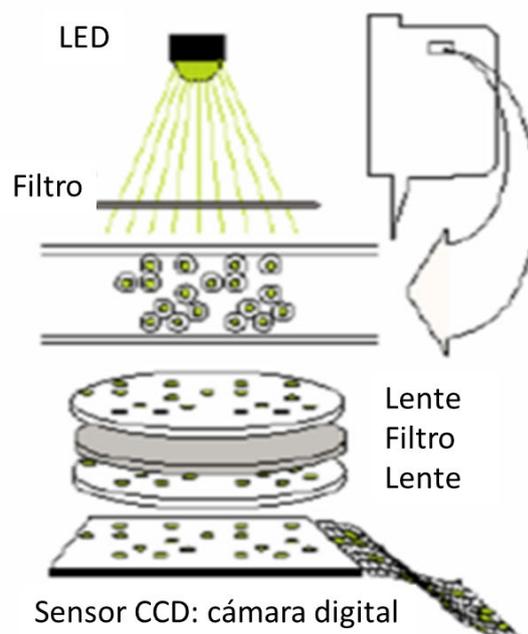


Figura 21: Mecanismo de funcionamiento del sistema automático portátil DeLaval cell Counter DCC para el recuento de células somáticas.



Figura 22: Sistema automático portátil DeLaval cell counter DCC para el recuento de células somáticas: cartucho (A) y lector (B).

4.3- LIBERACIÓN DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS INDUCIDA POR ANTIBIÓTICOS

Una vez validada la técnica de detección y cuantificación de endotoxinas mediante un método turbidimétrico cinético LAL, se realizó un procedimiento experimental para investigar los niveles de endotoxinas generados en la infección de la glándula mamaria por diferentes especies bacterianas Gram negativas cuando se encuentran a una concentración similar a la que se alcanza en la infección de forma natural y para monitorizar la liberación de estas endotoxinas tras la exposición a cuatro antibióticos diferentes empleados de forma habitual en el tratamiento de mamitis clínicas en el ganado bovino, tres betalactámicos, cefalosporina (CF), cefapirina (CSY) y bencilpenicilina (BP), y un aminoglucósido, la dihidroestreptomicina (ST).

4.3.1- Cultivos mini-ubre

Con el fin de reproducir las condiciones de la infección por bacterias Gram negativas en la glándula mamaria y poder determinar el efecto de los distintos antibióticos, tanto en la inhibición el crecimiento como en la liberación de endotoxinas, se diseñó un sistema de inoculación y cultivo en leche y en condiciones similares a la de esta glándula que hemos denominado como cultivos mini-ubre.

La validez de este modelo mini-ubre se valoró empleando dos cepas seleccionadas a partir de los aislamientos realizados de las leches de ganaderías en estudio. Las dos cepas seleccionadas fueron *E. coli* y *Enterobacter aerogenes* (*E. aerogenes*), ambas aisladas de muestras de leche de animales con mamitis clínica e identificadas según se ha indicado anteriormente. Tras la identificación se realizó un pase en medio líquido, empleando caldo nutritivo (CondaLab) e incubando durante 24 horas a 37°C. Completada la incubación y para su conservación, 500 µl de la suspensión bacteriana fueron transferidos a microtubo de 1,5 ml estéril adicionando 500 µl de glicerol (Sigma Aldrich) al 40 %, para su conservación en congelación a -20°C hasta el momento del ensayo.

Para el ensayo de mini-ubres se procedió, inicialmente, al descongelado de las cepas seleccionadas. Para ello se inoculó el volumen incluido en el microtubo congelado sobre 9 ml del caldo nutritivo, incubando en estufa a 37°C y en agitación (30 rpm) en condiciones de aerobiosis y durante 24 horas.

Finalizada esta incubación se determinó la concentración bacteriana alcanzada, realizando diluciones hasta la 10^{-8} y sembrando 1 ml de cada una de las diluciones en placas de agar nutritivo (CondaLab) utilizando el método de siembra en profundidad, tal y como se describe en los apartados 4.2.1.2 y 4.3.2. Tras la incubación a 37°C durante 24 h, se realizó el conteo de colonias en aquellas diluciones cuyo crecimiento estuvo entre 90 y 140 colonias para, posteriormente, realizar el cálculo de la concentración bacteriana en función del recuento realizado y la dilución de siembra (Figuras 23 y 24).

Una vez realizada la cuantificación del crecimiento bacteriano, se estimó para cada cepa el volumen de inóculo necesario para alcanzar en el volumen de 500 ml de leche una concentración de 10^7 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml, un valor similar al que se alcanza en una infección de la glándula mamaria.

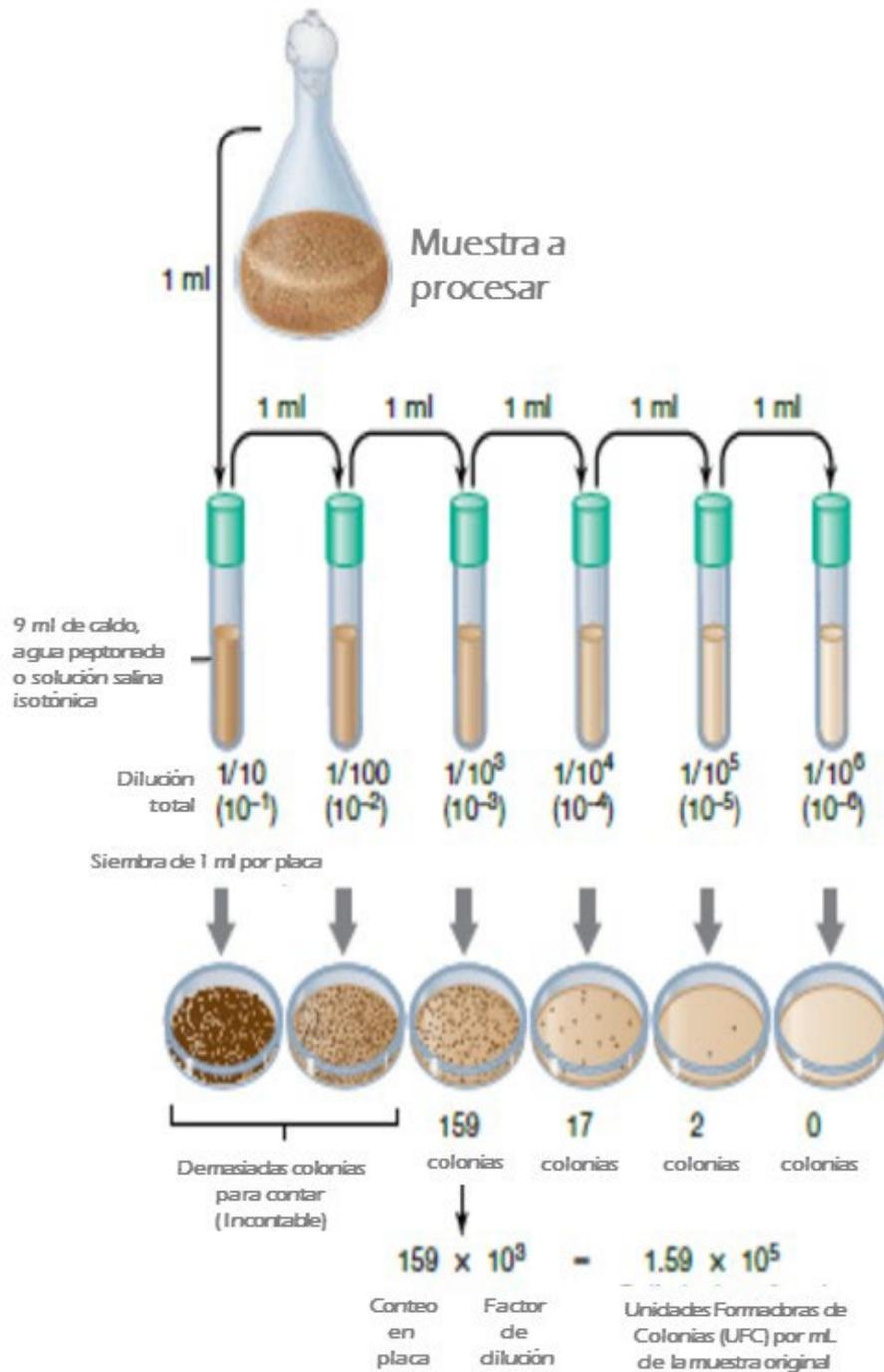


Figura 23: Representación esquemática del proceso de recuento bacteriano y los posteriores cálculos para su expresión en unidades formadoras de colonias (UFC)/ml en una suspensión mediante la realización de diluciones seriadas. Adaptado de Madigan y col. (2019).

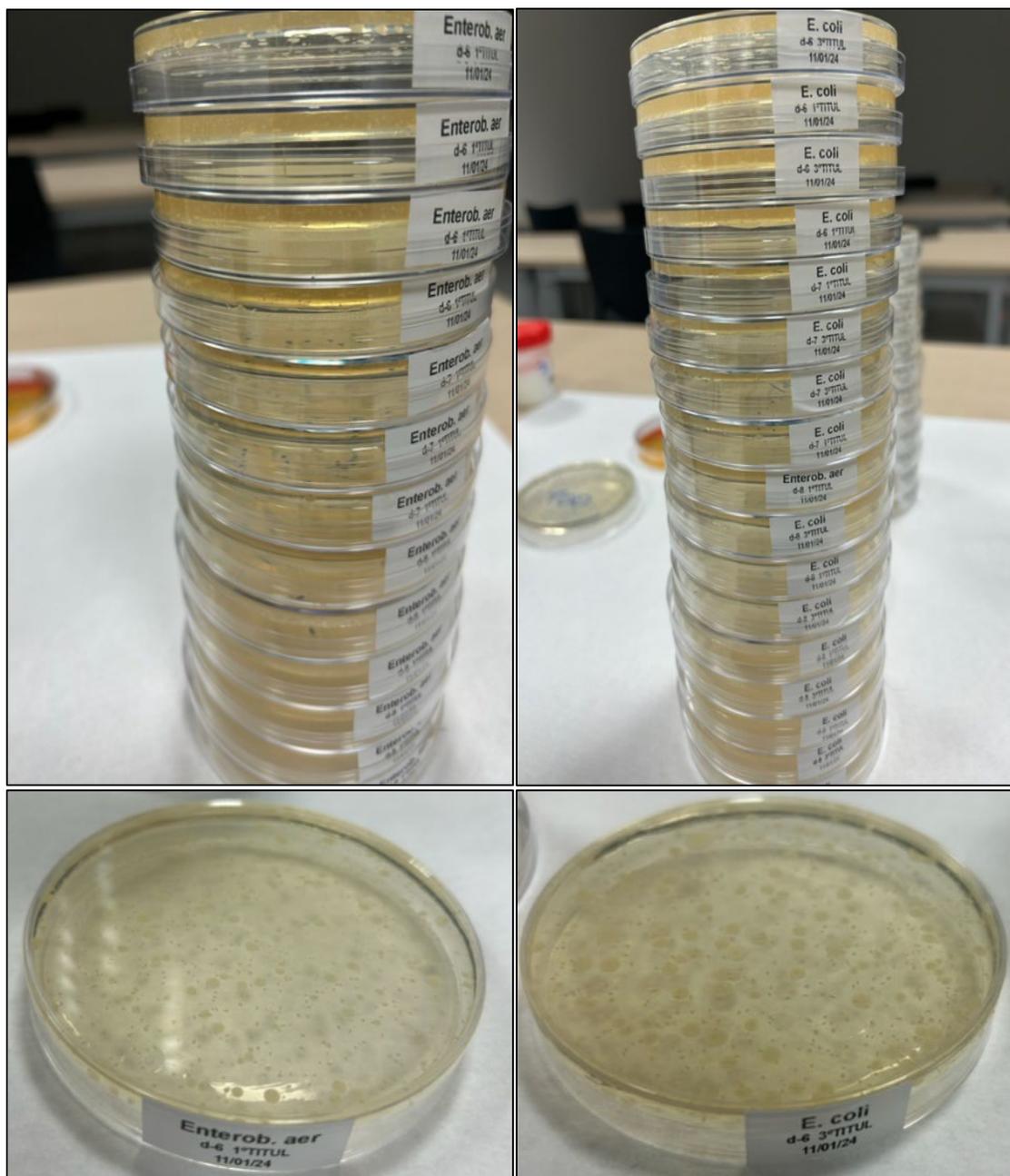


Figura 24: Placas empleadas para la determinación de la concentración bacteriana, expresada como unidades formadoras de colonias (UFC)/ml, mediante un sistema de dilución y siembra en placa.

Una vez cuantificada la concentración en la suspensión bacteriana, se utilizó leche pasteurizada, previamente analizada y determinada como libre de endotoxinas y sin crecimiento de bacterias Gram negativas, para simular la infección de la ubre. Para ello, inicialmente, se distribuyó un volumen de 500 ml de leche en cada uno de dos matraces estériles de 1 litro de capacidad. Estos matraces fueron inoculados, respectivamente, con cada una de las dos especies de bacterias Gram negativas seleccionadas; el primero de ellos se inoculó con el aislado de *E. coli* y el segundo con el aislado de *E. aerogenes*, utilizando el volumen necesario para cada cepa que permitiese alcanzar una concentración de 10^7 UFC/ml en la suspensión.

Una vez inoculada y homogeneizada la suspensión bacteriana en leche, para ambos matraces, se tomaron cuatro alícuotas de 40 ml en sendos matraces estériles, adicionando a cada una de ellas uno de los antibióticos seleccionados (Figura 25). La dosis de antibiótico empleada fue la determinada como concentración mínima inhibitoria que inhibe el 90 % de los aislados o CMI₉₀, según los datos recogidos en la base de datos *Antimicrobial Index*, una herramienta que recoge información de sensibilidad para más de 67.000 microorganismos y 4.000 antimicrobianos. Este proyecto financiado por TOKU-E, un líder global en biotecnología e innovación, está disponible en abierto en internet (<https://antibiotics.toku-e.com>).

La concentración de antibiótico empleada fue de 16 µg/ml para CF, 16 µg/ml para la CSY, 64 µg/ml para la BP y 8 µg/ml para la ST.

Una vez incorporado el antibiótico, los matraces se incubaron a 37°C y en agitación (30 rpm), recogiendo muestras a diferentes tiempos (30, 60, 120, 180 y 360 minutos). En cada una de las muestras se determinó el efecto del tratamiento tanto sobre el crecimiento de la bacteria como sobre la liberación de endotoxinas, tal y como se muestra en la Figura 26. Adicionalmente, se realizó el mismo procedimiento en un matraz de leche inoculada con la suspensión bacteriana, pero sin tratamiento antibiótico, para determinar la relación entre concentración de bacteria y capacidad máxima de liberación de endotoxinas de manera natural (cultivo control).

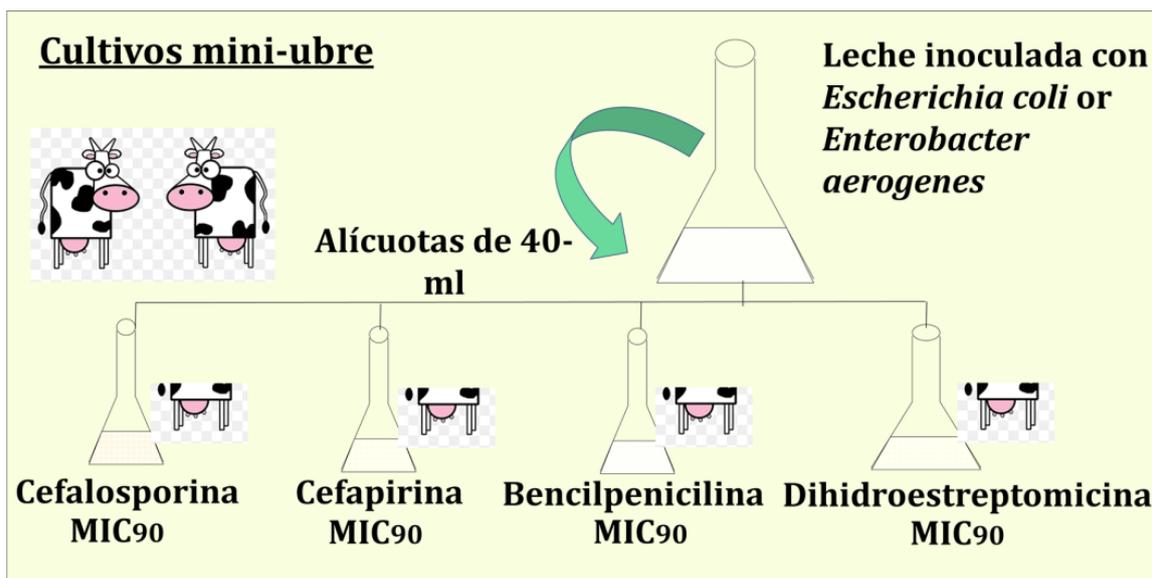


Figura 25: Diseño experimental para la simulación de las condiciones de la infección de la glándula mamaria por bacterias Gram negativas y del efecto del tratamiento con la concentración mínima que inhibe al 90 % de los aislados o CMI₉₀ con cuatro antibióticos empleando cultivos mini-ubre.

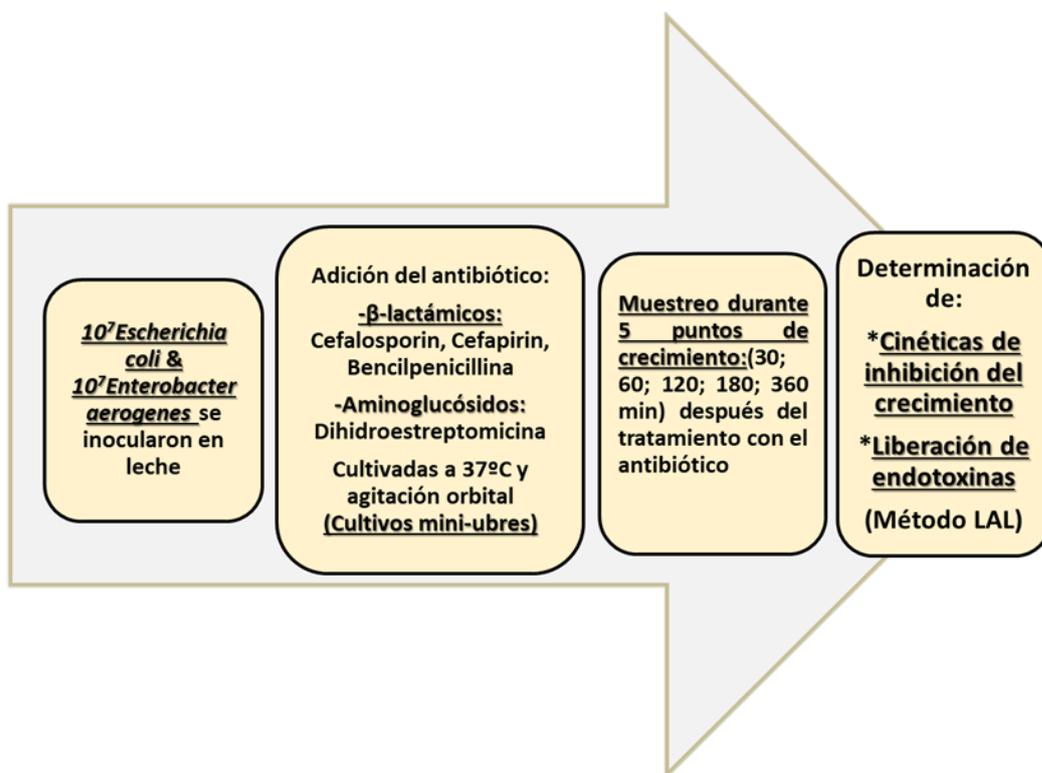


Figura 26: Determinación del efecto del tratamiento antibiótico sobre el crecimiento bacteriano y la liberación de endotoxinas mediante el empleo de cultivos mini-ubre.

4.3.2- Determinación de la cinética de crecimiento bacteriano

Para la determinación de la cinética de crecimiento de las dos cepas del estudio y en los tiempos indicados (30, 60, 120, 180 y 360 minutos) se empleó una alícuota de 1 ml recogida en condiciones de esterilidad en cada uno de los tiempos indicados y de cada uno de los matraces con los diferentes tratamientos, incluido el control.

Para estimar la concentración bacteriana se realizaron diluciones decimales en agua de peptona tamponada (CondaLab), hasta la 10^{-8} , realizando la siembra de 1 ml de cada una de las diluciones sobre agar nutritivo, utilizando el método de siembra en profundidad y por duplicado. Para realizar la siembra en profundidad se depositó el volumen de 1 ml de cada dilución sobre una placa de Petri vacía y estéril, vertiendo de forma inmediata sobre este volumen 12 ml de agar nutritivo atemperado. Realizando giros en forma de ocho de la placa sobre una superficie plana se mezcló todo el contenido de manera homogénea para, seguidamente, dejar solidificar el medio bajo flujo estéril dentro de una cabina de seguridad biológica. Una vez solidificadas, las placas se voltearon para su incubación en estufa a 37°C y durante 24 h.

4.3.3- Determinación de la cinética de liberación de endotoxinas

La cinética de liberación de endotoxinas se determinó mediante la medición de las endotoxinas presentes en la muestra, liberadas por acción del antibiótico, así como en el blanco o control, mediante el método turbidimétrico cinético desarrollado y validado previamente. Las muestras procesadas correspondieron a aquellas obtenidas a tiempo final, es decir, 360 minutos tras la adición del antibiótico a los cultivos mini-ubre.

La determinación se realizó tras la dilución de la alícuota a las diluciones 1:500 y 1:1000 y su filtrado a través de un filtro de PVDF de 0,45 nm de tamaño de poro (Millex-HV, Merck-Millipore) utilizando una jeringuilla estéril, tal y como se ha descrito anteriormente (apartado 4.1.2.4). Seguidamente, cada muestra se mezcló con el reactivo de sustrato LAL, se dispensó en placas de 96 pocillos y se incubó en el lector turbidimétrico a 37°C, monitorizando automáticamente el desarrollo de turbidez mediante la lectura a 340 nm cada 30 segundos y durante un tiempo de incubación de una hora (BIOTEK lector turbidimétrico, Lonza, Porriño, Pontevedra, España).

4.4- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos fueron almacenados en la hoja de cálculo Excel y para el análisis estadístico se utilizó el software IBM SPSS Statistics (versión 26.0, Chicago, IL, EE. UU.), disponible a través de la Universidad de León.

Las variables numéricas como el tiempo de reacción, la concentración de endotoxina, el RCS o el recuento bacteriano en las diferentes determinaciones fueron descritas empleando la media aritmética y la mediana como medidas de tendencia central y la desviación (DE) y el rango como medidas de dispersión. Además, para evaluar y comparar la dispersión o variación entre medidas repetidas empleamos el coeficiente de variación (CV), un valor que permite describir la relación entre el tamaño de una media y la variabilidad de una variable con independencia de la escala de la variable. Además, para las estimaciones de la concentración de endotoxinas en leche de tanque o en leches comerciales se determinó el intervalo 95 % de las estimaciones realizadas.

La correlación entre los valores determinados de actividad de endotoxina y el RCS o el recuento en una suspensión bacteriana se investigó empleando el coeficiente de correlación *Rho* de Pearson, una medida de dependencia lineal entre dos variables aleatorias cuantitativas y que es independiente de la escala de medida de las variables. El valor de *Rho* varía en el intervalo -1 a +1, indicando el signo el sentido de la relación. Así, un coeficiente de valor +1 indica correlación positiva perfecta o, lo que es lo mismo, dependencia total y directa entre las dos variables: cuando una de ellas aumenta, la otra también lo hace y en proporción constante. Por el contrario, un valor de *Rho* de -1 indica correlación negativa perfecta, cuando una variable aumenta, la otra disminuye de forma directamente proporcional. Finalmente, un valor de 0 o próximo a cero indica que no existe relación lineal entre ambas variables

5- RESULTADOS

5.1- OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO TURBIDIMÉTRICO CINÉTICO LAL PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ENDOTOXINAS EN MUESTRAS DE LECHE

La primera parte del trabajo experimental se orientó hacia la puesta a punto y validación de una técnica de cuantificación de endotoxinas adaptada y optimizada para la matriz leche a partir de un ensayo turbidimétrico cinético LAL (del inglés *Limulus ameobocyte lysate*) comercial utilizado para los estudios de endotoxinas en agua purificada de uso farmacéutico, así como en diversos productos farmacológicos según las diferentes farmacopeas. Tal y como se ha descrito en el apartado de Material y Métodos, las modificaciones con respecto al protocolo empleado para otras matrices incluyeron el uso de mayor número de puntos en la curva de calibración, la filtración inicial de las muestras y su dilución.

5.1.1- Efecto de la filtración

Uno de los retos que plantea la optimización de un método para la determinación de la actividad de endotoxinas en leche es consecuencia de la presencia en esta matriz de sustancias interferentes, inherentes a la complejidad de la misma y que pueden afectar a la cascada enzimática en la reacción LAL, así como la dilución necesaria para evitar la interferencia del color en las lecturas de turbidez. Ambas características dificultan las determinaciones y hacen necesaria una etapa de validación previa que permita asegurar la fiabilidad de la técnica.

En nuestro caso, para minimizar el efecto de interferentes decidimos incorporar una etapa inicial de filtración de las muestras a través de un filtro de polivinilideno de fluoruro (PVDF). El efecto del filtrado sobre la determinación de endotoxinas se evaluó procesando estándares de endotoxinas y agua libre de endotoxinas, tanto de forma directa como tras su filtración.

La Tabla 2 muestra los resultados obtenidos en 10 réplicas de estos estándares y blanco, en forma de tiempos de reacción, así como la media y desviación estándar.

TIEMPOS DE REACCIÓN (segundos)										
Estándar (EU/ml)	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
50	599,3	620,6	598,2	618,7	600,9	604,1	610,6	603,4	614,8	607,3
5	929,3	964,5	945,7	933	941,8	932,7	930,4	958,7	964,1	959,8
0,5	1.545	1.587,5	1.569,2	1.552,9	1575,4	1548,4	1562,3	1.580,2	1.573,5	1.549,3
0,05	3.006	3.090	3.018,3	3.035,7	3.027,1	3.042	3.036,8	3.033,9	3.041,7	3.054,5
Control negativo	>3.150	>3.150	>3.150	>3.150	>3.150	>3.150	>3.150	>3.150	>3.150	>3.150
Estándar (EU/ml)	RF1	RF2	RF3	RF4	RF5	RF6	RF7	RF8	RF9	RF10
50	603,7	622,4	609,3	627,8	615,4	616,7	605,9	619	625,1	625,6
5	938,7	956,4	939,4	971,7	936,5	926,6	943,5	956,1	965,3	936
0,5	1.563,7	1.535,1	1.549,3	1.568,2	1.543,5	1.568	1.576,5	1.548,8	1.565,9	1.571,4
0,05	3.015,6	3.021,2	3.045,1	3.056,7	3.038,7	3.064,9	3.063,4	3.058,2	3.054,3	3.067,2
Control negativo	>3.150	>3.150	>3.150	>3.150	>3.150	>3.150	>3.150	>3.150	>3.150	>3.150

Estándar (EU/ml)	Media	DE	Estándar (EU/ml)	Media	DE
50	607,3	8,32	50	617,1	8,07
5	946	13,81	5	947	13,79
0,5	1.564,4	14,17	0,5	1.559	13,06
0,05	3.038,6	21,35	0,05	3.048,5	17,24
Control negativo	>3.150	0	Control negativo	>3.150	0

DE: desviación estándar;

Tabla 2: Tiempos de reacción expresados en segundos de las cinéticas turbidimétricas de patrones y controles negativos (blancos) sin filtrar y tras la filtración utilizando el filtro de polivinilideno de fluoruro (PVDF). R1-R10: réplicas no filtradas; RF1-RF10: réplicas filtradas.

Las concentraciones de los patrones se expresan en unidades de endotoxina (EU) por ml.

Además, como se puede ver en los dos ejemplos que se muestran en la Figura 27, las curvas de calibración obtenidas con estándares filtrados y sin filtrar fueron muy similares.

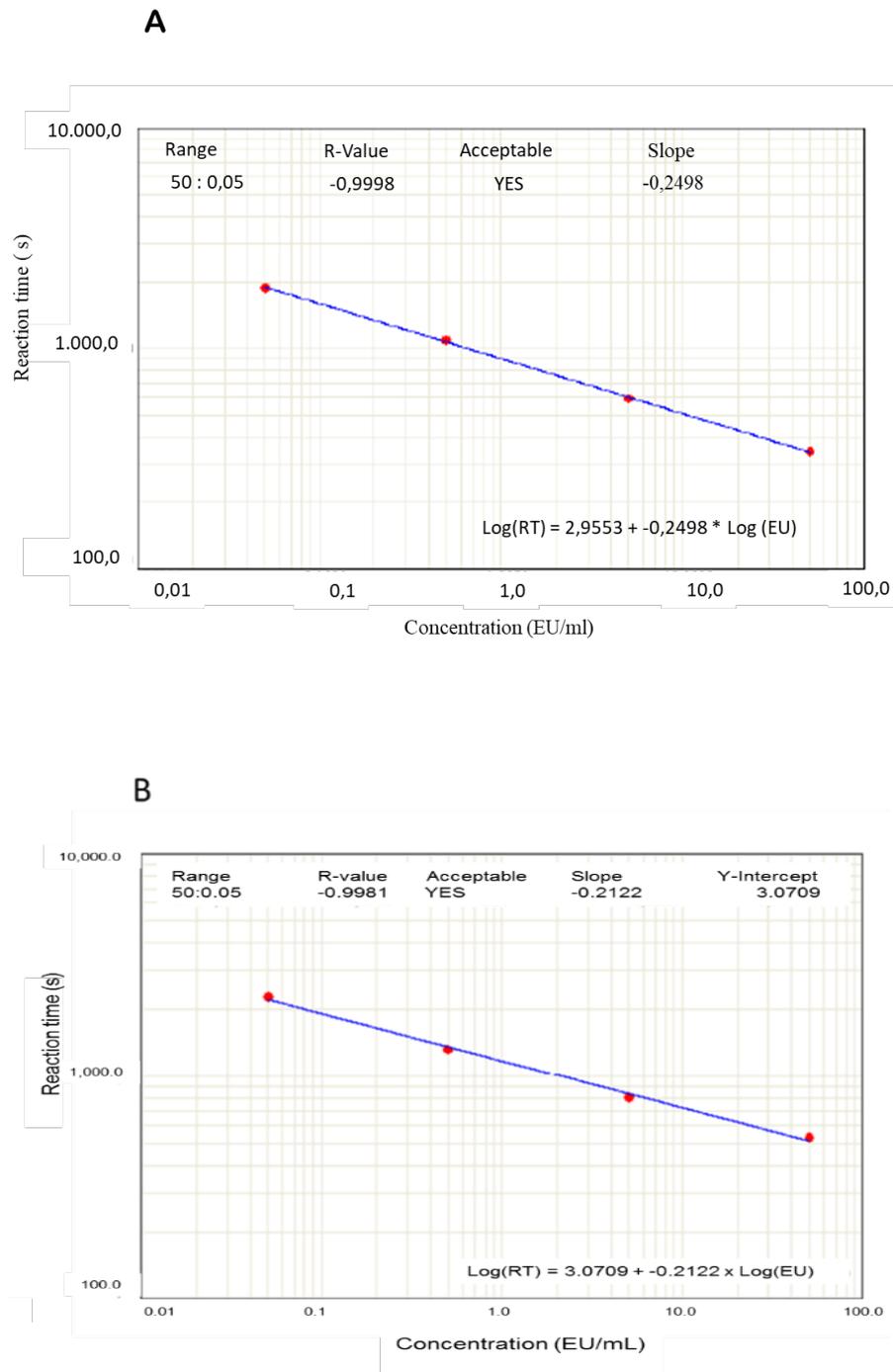
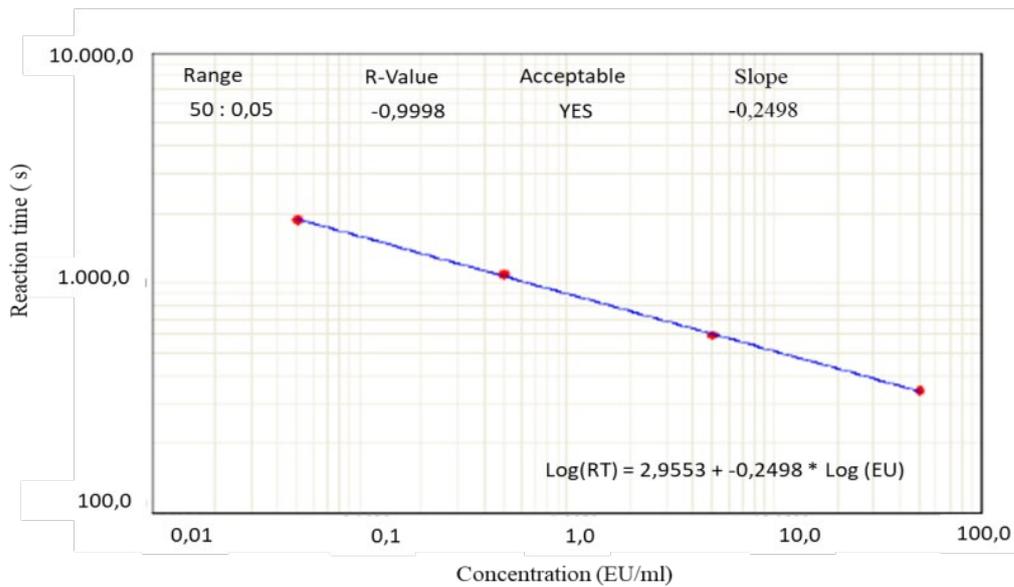


Figura 27. Curvas de calibración obtenidas con estándares de endotoxina de 50, 5, 0,5 y 0,05 unidades de endotoxina (EU) por ml no filtrados (A) y filtrados (B) a través de un filtro de polivinilideno de floururo (PVDF).

5.1.2- Curvas de calibración, coeficientes de variación (CV) y tasa de recuperación

En cada experimento se realizó una curva de calibración, determinando, como controles de calidad internos, su linealidad (valor de R) y el coeficiente de variación (CV) en las réplicas de los diferentes estándares. Para todos los procedimientos se aceptaron como parámetros de validación de la técnica un coeficiente de linealidad R superior a 0,995 y valores del CV entre réplicas inferior al 10 % (Figura 28).



Ident.	Expected Concentration	Well Layout	CV%	CV < 10%	Calculated Value
STD1	50 EU/mL	A1	3,21	VALID	>49,1920
		A2		VALID	
STD2	5 EU/mL	B1	3,35	VALID	5,3432
		B2		VALID	
STD3	0,5 EU/mL	C1	0,05	VALID	0,4598
		C2		VALID	
STD4	0,05 EU/mL	D1	0,74	VALID	<0,0517
		D2		VALID	
CTRL1		E1	0,00	VALID	<0,0500
		E2		VALID	

Figura 28. Ejemplo de recta de calibración y criterios de aceptación: linealidad de la recta ($R > 0,995$) y coeficiente de variación (CV) entre réplicas de los patrones inferior al 10 %. Las concentraciones de los patrones se expresan en unidades de endotoxina (EU) por ml.

Además de los estándares, también las muestras fueron procesadas en cada procedimiento por duplicado, estimando el CV entre réplicas para identificar la dispersión o grado de variabilidad en las estimaciones realizadas, tanto en muestras de leche como en estándares filtrados y no filtrados. Como se observa en las Tablas 3 y 4, este CV fue inferior al 5 % en todos los casos, oscilando en un rango de 0,00 y 3,22 % para los estándares y blancos y de 0,00 a 3,44 % para las muestras de leche.

Coefficiente de variación (CV)					
	Estándares de endotoxina (EU/ml)				Blanco (EU/ml)
	50	5	0,5	0,05	
Estándares filtrados	2,99 %	2,34 %	1,25 %	0,64 %	0 %
Estándares sin filtración	2,16 %	1,86 %	1,36 %	1,38 %	0 %

Tabla 3: Valor medio de los coeficientes de variación (CV) entre las réplicas de los estándares de endotoxina (50, 5, 0,5 y 0,05 unidades de endotoxina (EU)/ml) y el blanco (agua ultrapura libre de endotoxinas) no filtrados y filtrados a través de filtro de polivinilideno de fluoruro (PVDF) obtenidos en la determinación de la actividad de endotoxina empleando un método turbidimétrico cinético.

Coefficiente de variación (CV)			
	Muestras de leche procedentes de vacas con mamitis clínica	Muestras de tanque de leche	Muestras de leche comercial
Filtradas	2,62 %	2,23 %	1,24 %

Tabla 4: Valor medio de los coeficientes de variación (CV) entre las réplicas de las muestras de leche obtenidos en la determinación de la actividad de endotoxina empleando un método turbidimétrico cinético.

Finalmente, y con el fin de monitorizar la presencia y el efecto de sustancias interferentes, cada muestra fue suplementada con una concentración conocida de endotoxina. En la Figura 29A podemos ver un ejemplo de expresión de resultados conforme a los cálculos que realiza el software del equipo. La concentración de endotoxina adicionada fue de 0,5 unidades de endotoxina (EU)/ml, mientras que la de la muestra fue de 0,0997 EU/ml. En el caso de la muestra cebada la concentración obtenida fue de 0,6254 EU/ml. En un escenario de recuperación del 100 %, la concentración teórica de la muestra cebada sería de 0,5 EU/ml más 0,0997, es decir 0,5997. Al recuperar un valor ligeramente superior (0,6254 EU/ml), se estima un porcentaje de recuperación del 105 %, tal y como muestra el cálculo del equipo. Estos datos indican que se recupera prácticamente la misma concentración de endotoxina adicionada. De forma similar, si se recupera menor cantidad que la adicionada, el porcentaje de recuperación será inferior al 100 %.

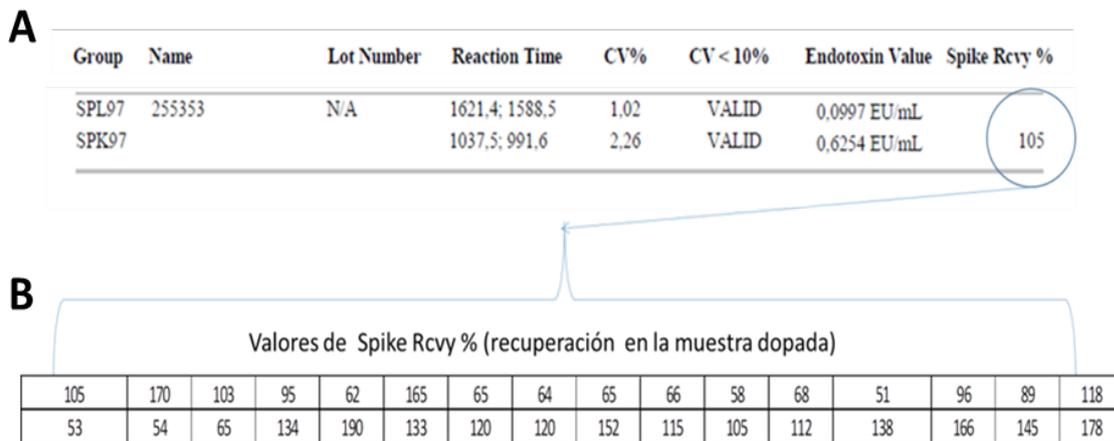


Figura 29: Valores de porcentaje de recuperación de una concentración conocida de endotoxinas en muestras cebadas o “spike” (B). Se incluye un ejemplo de esta recuperación conforme los cálculos del software (A). Las concentraciones de endotoxinas se expresan en unidades de endotoxina (UE)/ml.

La tasa de recuperación determinada para las muestras cebadas con una concentración conocida de endotoxina estuvo en el rango considerado aceptable por el fabricante del test (50 a 200 %), con valores que variaron entre el 51 y el 190 %, en más del 95 % de las muestras de leche analizadas (Figura 29B).

5.1.3- Validación del ensayo LAL optimizado en la matriz leche

Teniendo en cuenta las directrices de validación indicadas en las normas ISO (Organización Internacional de Normalización, del inglés *International Organization for Standardization*) 5725-1:1994 (ISO, 1994) y ISO 19036:2019 (ISO, 2019), para la validación intralaboratorial de la técnica turbidimétrica cinética LAL en la matriz leche se procesaron cinco réplicas de los estándares de endotoxinas y de una muestra de leche sin endotoxinas suplementada con 5, 0,5 y 0,05 UE por ml. Estas determinaciones fueron realizadas por dos operadores diferentes y los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 5, 6 y 7.

En primer lugar, se determinó la exactitud, precisión, incertidumbre y veracidad de los patrones correspondientes a 50, 5, 0,5 y 0,05 EU/ml, realizados a partir de diluciones seriadas del patrón comercial de 50 EU/ml. Como se puede observar, tanto la incertidumbre del método como la precisión y veracidad en condiciones de reproducibilidad, varían en función del rango o nivel de concentración. Así, estos parámetros mostraron valores superiores a mayores concentraciones, encontrándose los resultados más altos en el rango superior de medida (50 EU/ml) y los más bajos en el rango inferior de medida (0,05 EU/ml). Por su parte, la exactitud también varió en función del rango de medida, mostrando valores de 9,305, 5,618, 8,044 y 1,620 % para los patrones de 50, 5, 0,5 y 0,05 EU/ml respectivamente (Tabla 5).

Concentración de patrón certificado (EU/ml)	Media (EU/ml)	Precisión (DE)	Veracidad (V)	Incertidumbre (U) (k = 2,95 %)	Exactitud (%)
0,05	0,051	0,004	0,001	0,009	1,620
0,5	0,540	0,025	0,040	0,094	8,044
5	5,281	0,405	0,281	0,986	5,618
50	54,652	6,562	4,652	16,088	9,305

EU: unidades de endotoxina; DE: desviación estándar; U (incertidumbre) = $2 * \sqrt{DE^2 + V^2}$

Tabla 5: Validación del ensayo turbidimétrico cinético *Limulus amoebocyte lysate* (LAL) para la cuantificación de endotoxinas en muestras de leche: resultados obtenidos con cinco réplicas procesadas por dos operadores sobre los estándares de endotoxina.

En la tabla 6 se muestran los resultados de la media, precisión, veracidad, incertidumbre y exactitud para la cuantificación de muestras de leche cebadas con diferentes concentraciones de endotoxinas (5, 0,5 y 0,05 EU/ml). En todos los casos, los valores variaron en dependencia del rango de medida. Como se puede observar, tanto la precisión como la veracidad aumentan conforme se incrementa el valor del patrón adicionado. En el caso de la incertidumbre, ésta es mayor en los rangos altos y bajos frente al rango medio. Finalmente, la exactitud mostró valores muy similares en el rango superior e inferior de la técnica y menores a éstos en el rango intermedio.

Finalmente, los resultados globales de esta validación, incluyendo tanto los resultados obtenidos con los estándares de endotoxina y el blanco, así como con las muestras de leche procesadas se muestran en la Tabla 7. De nuevo, los valores de los parámetros variaron dependiendo del rango de concentración de endotoxinas en la muestra y tanto la precisión como la verosimilitud, la incertidumbre y la exactitud se incrementaron conforme esta concentración medida aumentaba.

Concentración (EU/ml)	Media (EU/ml)	Precisión (DE)	Veracidad (V)	Incertidumbre (U) (k = 2,95 %)	Exactitud (%)
0,05	0,053	0,009	0,003	0,20	6,600
0,5	0,521	0,042	0,021	0,094	4,260
5	5,340	0,390	0,340	1,035	6,800

EU: unidades de endotoxina; DE: desviación estándar; U (incertidumbre) = $2 * \sqrt{DE^2 + V^2}$

Tabla 6: Validación del ensayo turbidimétrico cinético *Limulus amoebocite lysate* (LAL) para la cuantificación de endotoxinas en muestras de leche: resultados obtenidos con cinco réplicas procesadas por dos operadores sobre una muestra de leche libre de endotoxinas suplementada con diferentes concentraciones de endotoxina.

Concentración (EU/ml)	Media (EU/ml)	Precisión (DE)	Veracidad (V)	Incertidumbre (U) (k = 2,95 %)	Exactitud (%)
0,05	0,052	0,007	0,002	0,015	4,110
0,5	0,530	0,035	0,030	0,093	6,052
5	5,310	0,388	0,310	0,994	6,209

EU: unidades de endotoxina; DE: desviación estándar; U = $2 * \sqrt{DE^2 + V^2}$

Tabla 7: Validación global del ensayo turbidimétrico cinético *Limulus amoebocite lysate* LAL para la cuantificación de endotoxinas en muestras de leche: resultados obtenidos con cinco réplicas procesadas por dos operadores sobre estándares de endotoxina y sobre muestras de leche libre de endotoxinas suplementadas con diferentes concentraciones de endotoxina.

Adicionalmente se validó la técnica en condiciones de repetibilidad, mismo método, laboratorio, operario, equipo y muestras en corto periodo de tiempo, y reproducibilidad, mismo método y muestras, pero diferente laboratorio, método u operador. Para la evaluación de la repetibilidad se emplearon cuatro muestras de leche, dos con una concentración intermedia de endotoxinas (75-80 UE/ml), una con una elevada concentración de endotoxinas (2.000 UE/ml) y una con baja concentración de endotoxinas (28 UE/ml). La reproducibilidad se determinó utilizando 12 muestras de leche dentro de cada concentración de endotoxina (alta, media y baja) que fueron medidas por dos operarios en días diferentes y utilizando dos réplicas por muestra.

Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 8 y 9 siendo destacable que ambos parámetros fueron más elevados para las determinaciones en el rango intermedio en comparación con las de las concentraciones alta y baja.

Condiciones de repetibilidad				
		Media*	DE	CV (%)
Concentración de endotoxina	Alta	5,193	0,936	18,022
	Moderada	0,696	0,185	26,562
	Baja	0,363	0,031	8,535

EU: unidades de endotoxina; DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación; *Valores no corregidos (tener en cuenta la dilución para estimar la concentración de endotoxina)

Tabla 8: Repetibilidad determinada para el ensayo turbidimétrico cinético *Limulus ameboocyte lysate* (LAL) para la cuantificación de endotoxinas en muestras de leche empleando muestras con elevada, moderada y baja concentración de endotoxina.

Condiciones de reproductibilidad				
		Media*	DE	CV (%)
Concentración de endotoxina	Alta	4,86	0,355	7,297
	Moderada	0,15	0,018	11,863
	Baja	0,06	0,004	6,937

EU: unidades de endotoxina; DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación; *Valores no corregidos (tener en cuenta la dilución para estimar la concentración de endotoxina)

Tabla 9: Reproducibilidad determinada para el ensayo turbidimétrico cinético *Limulus ameobocite lysate* (LAL) para la cuantificación de endotoxinas en muestras de leche empleando muestras con elevada, moderada y baja concentración de endotoxina.

5.1.4- Determinación de la actividad de endotoxinas en muestras de leche

Se procesaron un total de 15 muestras de leche recogidas en vacas con mamitis clínica, así como 5 muestras de leche de tanque y 5 muestras de leche comercial UHT (uperizada, del inglés *ultrahigh temperature*). En todas ellas se determinó la actividad de endotoxina empleando el ensayo turbidimétrico cinético puesto a punto. Las muestras procedentes de animales con mamitis clínicas fueron procesadas para la identificación del microorganismo implicado y tanto estas muestras como las muestras de tanque de leche fueron procesadas de forma automática para obtener el recuento de células somáticas (RCS), tal y como se ha indicado en las secciones 4.2.1 y 4.2.2 de Material y Métodos de esta tesis.

5.1.4.1- Muestras de leche recogidas en vacas con mamitis clínica

Los resultados obtenidos con las muestras de animales enfermos se muestran en la Tabla 10.

Como cabía esperar, entre las muestras de leche recogida de vacas con mastitis clínica los resultados de actividad de endotoxina fueron muy variables y estuvieron relacionados con el microorganismo implicado en la infección. La técnica optimizada demostró su capacidad para detectar y cuantificar endotoxinas en un amplio rango, desde valores negativos (< 25 EU/ml) y hasta valores próximos a 30.000 EU/ml.

Identificación Muestra	Concentración de endotoxinas (EU/ml)	RCS (cls/ml)	Microorganismo implicado
151677	570	951.650	<i>Escherichia coli</i>
151678	29.000	1.457.000	<i>Escherichia coli</i>
151679	22.000	1.120.500	<i>Escherichia coli</i>
151680	< 25	856.930	<i>Staphylococcus coagulasa</i> negativo
151681	< 25	958.670	<i>Serratia marcescens</i>
151682	< 25	657.000	<i>Staphylococcus coagulasa</i> negativo
182179	< 25	858.000	<i>Staphylococcus aureus</i>
182180	< 25	856.930	<i>Streptococcus agalactiae</i>
182181	< 25	1.587.600	<i>Mycoplasma bovis</i>
182182	27.000	1.389.000	<i>Escherichia coli</i>
182183	25.300	1.125.320	<i>Enterobacter aerogenes</i>
182184	21.800	978.580	<i>Enterobacter aerogenes</i>
182185	17.500	898.000	<i>Enterobacter aerogenes</i>
186186	875	589.000	<i>Enterobacter aerogenes</i>
182187	32800	1.907.800	<i>Escherichia coli</i>

Tabla 10: Concentración de endotoxinas expresadas en unidades de endotoxina (UE)/ml, recuento de células somáticas (RCS) expresado en células (cls)/ml y resultados de microbiología en muestras de leche recogidas en vacas con mamitis clínica.

No se detectaron endotoxinas (< 25 EU/ml) en ninguna de las muestras en las que se identificó un microorganismo Gram positivo como agente etiológico ni en una muestra en la que la mamitis estaba asociada a *Mycoplasma bovis* (*M. bovis*).

Por el contrario, se detectaron concentraciones variables de endotoxina en todas las muestras de leche procedentes de animales con mamitis clínica por bacterias Gram negativas, con la única y sorprendente excepción de un caso asociado a *Serratia marcescens*. La concentración media de endotoxina en las muestras con detección positiva fue de 19.649,4 UE/ml (DE 11.606,06 EU/ml), con una mediana de 22.000 UE/ml y un mínimo de 570 EU/ml y máximo de 32.800 EU/ml. La comparación de la concentración de endotoxina en las muestras de leche positivas a las dos especies de bacterias Gram negativas detectadas, *Escherichia coli* (*E. coli*) (n=5) y *Enterobacter aerogenes* (*E. aerogenes*) (n=4) mediante ANOVA, demostró que no existían diferencias estadísticamente significativas, aunque los valores fueron más altos en las muestras positivas a *E. coli* (F = 0,542, p = 0,485) (Tabla 11).

Concentración de endotoxinas (EU/ml)						
	n	Media	DE	Intervalo de confianza 95 %		Mediana
<i>E. coli</i>	5	22.274,00	12.742,74	6.451,80	38.096,20	27.000,00
<i>E. aerogenes</i>	4	16.368,75	10.810,52	833,19	33.579,69	19.650,00

Tabla 11: Concentración de endotoxinas en las muestras de leche procedentes de animales con mamitis clínica asociada a bacterias Gram negativas.

En lo que respecta a la relación entre la actividad de endotoxina y el RCS, se demostró una correlación positiva significativa entre ambos parámetros para las muestras de leche con mamitis por bacterias Gram negativas (Rho = 0,891, p = 0,001). Como se observa en la Figura 30, esta correlación fue particularmente clara para los recuentos superiores a 1.000.000 cls/ml.

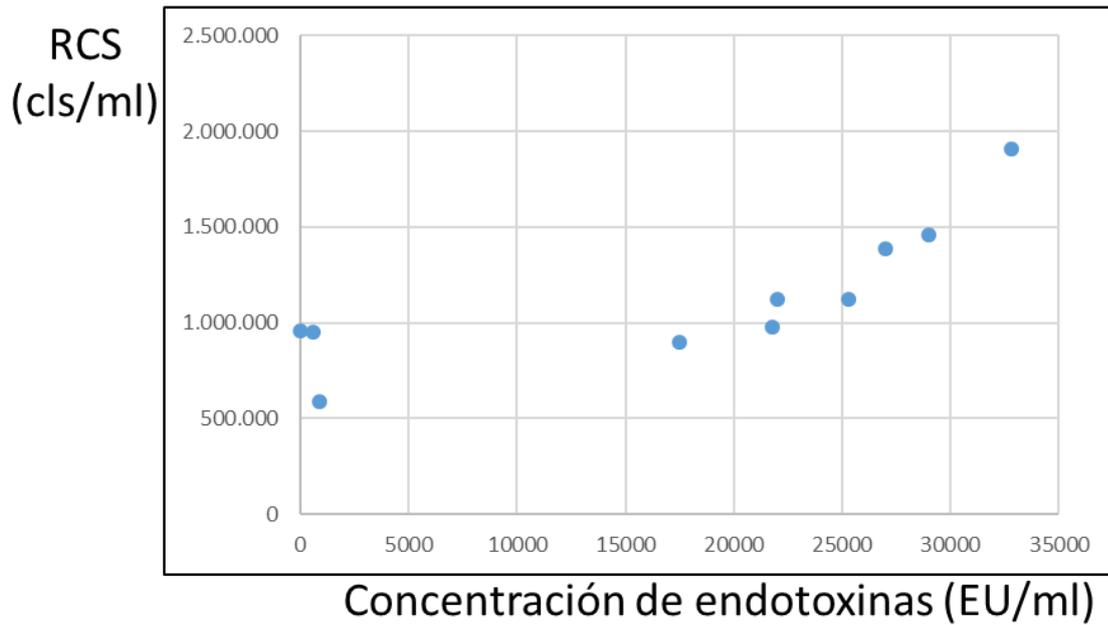


Figura 30: Correlación entre en el recuento de células somáticas (RCS) expresado en células (cls)/ml y la concentración de endotoxina expresada en unidades de endotoxina (EU)/ml en muestras de leche recuperadas de animales con mamitis clínica por bacterias Gram negativas.

Por el contrario, y como cabía esperar, no existió correlación entre la actividad de endotoxina determinada, en todos los casos inferior a 25 EU/ml, y el RCS para las muestras de leche de animales con mamitis clínica asociada a otras bacterias (Gram positivos o *M. bovis*), que varió entre valores ligeramente superiores a 600.000 cls/ml y hasta más de 1.500.000 cls/ml en el caso de la leche con mamitis causada por *M. bovis*. No fue posible estimar esta correlación por ser idéntico el resultado de concentración de endotoxina para todas estas muestras.

5.1.4.2- Muestras de tanque de leche

Los resultados obtenidos con las muestras de tanque de leche se muestran en la Tabla 12.

La concentración de endotoxina en muestras de leche de tanque varió entre menos de 25 y 270 EU/ml (mediana < 25 EU/ml) y no existió correlación entre el valor obtenido y el RCS determinado ($Rho = 0,670$, $p = 0,100$) (Figura 31).

Identificación muestra	Concentración de endotoxinas (EU/ml)	RCS (cls/ml)
149927	140	331.000
182406	< 25	435.000
196517	< 25	172.000
196518	< 25	224.000
206036	270	733.000
206037	180	389.000
206038	<25	198.000

Tabla 12: Concentración de endotoxinas expresadas en unidades de endotoxina (UE)/ml y recuento de células somáticas (RCS) expresado en células (cls)/ml en muestras de leche de tanques de leche.

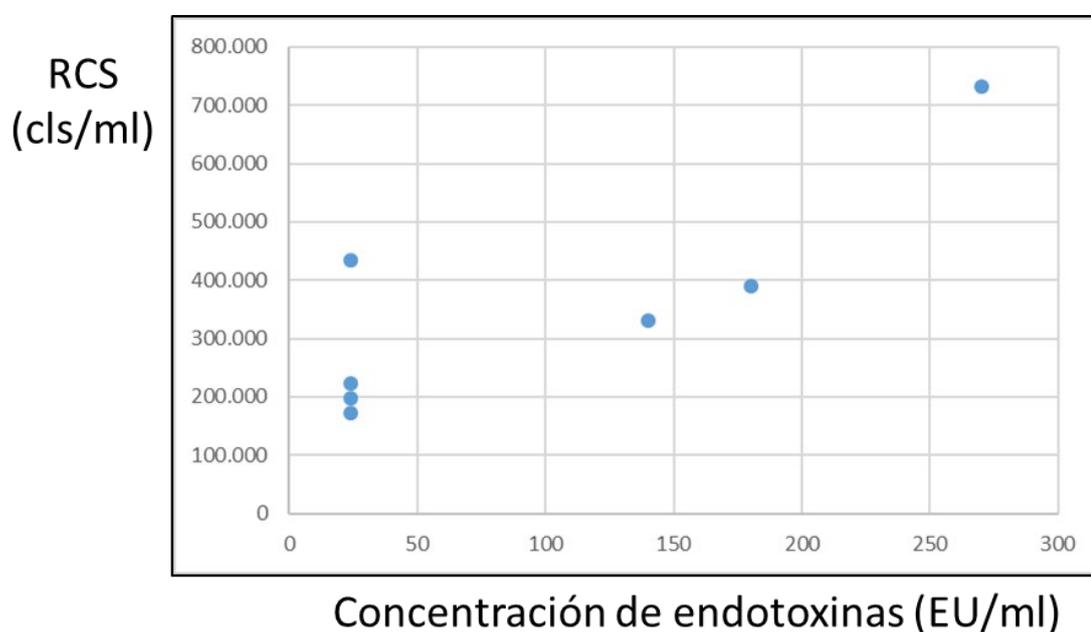


Figura 31: Correlación entre el recuento de células somáticas (RCS) expresado en células (cls)/ml y la concentración de endotoxina expresadas en unidades de endotoxina (UE)/ml en muestras de leche recuperadas de animales con mamitis clínica por bacterias Gram negativas.

5.1.4.3- Muestras de leche UHT comercial

Los resultados obtenidos con las muestras de leche UHT se muestran en la Tabla 13.

Identificación Muestra	Concentración de endotoxinas (EU/ml)
232807	34
232808	175
232809	57,08
232810	< 25
232811	164,5
232812	179,15
232813	87
232814	< 25
232815	< 25
132816	< 25

Tabla 13: Concentración de endotoxinas expresadas en unidades de endotoxina (UE)/ml en muestras de leche comercial UHT (uperizada o del inglés *ultrahigh temperature*).

Se detectó actividad de endotoxina en 6 de las 10 leches comerciales analizadas, con una concentración que varió entre < 25 y 179,15 UE/ml. El valor medio de la actividad de endotoxina en las muestras con detección positiva fue de 116,12 UE/ml (DE 64,59) y mediana de 125,75 UE/ml.

5.2- EMPLEO DE UN SISTEMA DE CULTIVO MINI-UBRE PARA EL ESTUDIO DE LA LIBERACIÓN DE ENDOTOXINAS INDUCIDA POR ANTIBIÓTICOS

En una segunda etapa, el trabajo experimental se dirigió hacia la optimización de un sistema específico de cultivo microbiológico que simula las condiciones de la infección intramamaria o sistema mini-ubre. Empleando este modelo hemos investigado la inhibición del crecimiento bacteriano y la liberación de endotoxinas asociada al tratamiento con diferentes antibióticos empleados en el tratamiento de la mastitis bovina. La investigación se ha llevado a cabo con dos especies de bacterias Gram negativas implicadas en mastitis clínicas del ganado bovino, *E. coli* y *E. aerogenes*, dado que fueron las dos especies de Gram negativos identificadas con mayor frecuencia en las muestras de leche de vacas con mastitis clínica en la primera etapa del trabajo, y para cuatro antibióticos empleados de forma habitual en el manejo clínico de mastitis bovina, tres betalactámicos (cefalosporina (CF), cefapirina (CSY) y bencilpenicilina (BP)) y un aminoglucósido (dihidroestreptomicina (ST)).

5.2.1- Cinética de la inhibición del crecimiento bacteriano

Los resultados del estudio de la cinética de inhibición inducida por los antibióticos valorados se muestran en la Tabla 14 y Figura 32.

Para ambas especies bacterianas, los antibióticos valorados provocaron una reducción del crecimiento, siendo este hecho más acentuado con el paso del tiempo. Así, durante la primera hora de tratamiento, las bacterias continuaron multiplicándose y los cultivos alcanzaron su punto máximo de crecimiento, comenzando la inhibición del crecimiento entre una y dos horas tras el tratamiento. Por el contrario, los cultivos control sin tratamiento antibiótico continuaron creciendo hasta alcanzar la fase estacionaria durante el periodo de estudio.

A <i>Escherichia coli</i> (UFC/ml)					
	0 h	1 h	2 h	3 h	6 h
Control	1,68E+07	1,55E+08	3,61E+08	2,27E+08	6,79E+08
Bencilpenicilina (BP)	1,68E+07	5,54E+07	7,71E+06	1,00E+00	1,00E+00*
Cefapirina (CSY)	1,68E+07	3,92E+07	2,92E+04	7,92E+03	5,68E+02
Dihidroestreptomicina (ST)	1,68E+07	1,68E+07	1,71E+06	1,00E+00	1,00E+00*
Cefalosporina (CF)	1,68E+07	8,96E+07	6,17E+04	8,30E+04	7,02E+02

*Pese a que no se recuperó colonia viable alguna, se considera el valor de una colonia a efectos prácticos para la representación logarítmica posterior.

B <i>Enterobacter aerogenes</i> (UFC/ml)					
	0 h	1 h	2 h	3 h	6 h
Control	1,79E+07	1,24E+08	5,20E+08	6,70E+08	8,40E+08
Bencilpenicilina (BP)	1,79E+07	1,36E+08	6,25E+07	8,05E+05	2,95E+04
Cefapirina (CSY)	1,79E+07	5,30E+07	1,90E+06	2,05E+04	3,95E+04
Dihidroestreptomicina (ST)	1,79E+07	1,16E+08	1,98E+07	8,00E+04	5,10E+04
Cefalosporina (CF)	1,79E+07	7,15E+07	6,75E+05	3,85E+04	2,35E+04

Tabla 14: Cinética de inhibición del crecimiento en unidades formadoras de colonias (UFC)/ml en los cultivos mini-ubre tratados con antibióticos: bencilpenicilina (BP), cefapirina (CSY), dihidroestreptomicina (ST) y cefalosporina (CF), así como en el control sin antibióticos.

A) *Escherichia coli* y B) *Enterobacter aerogenes*.

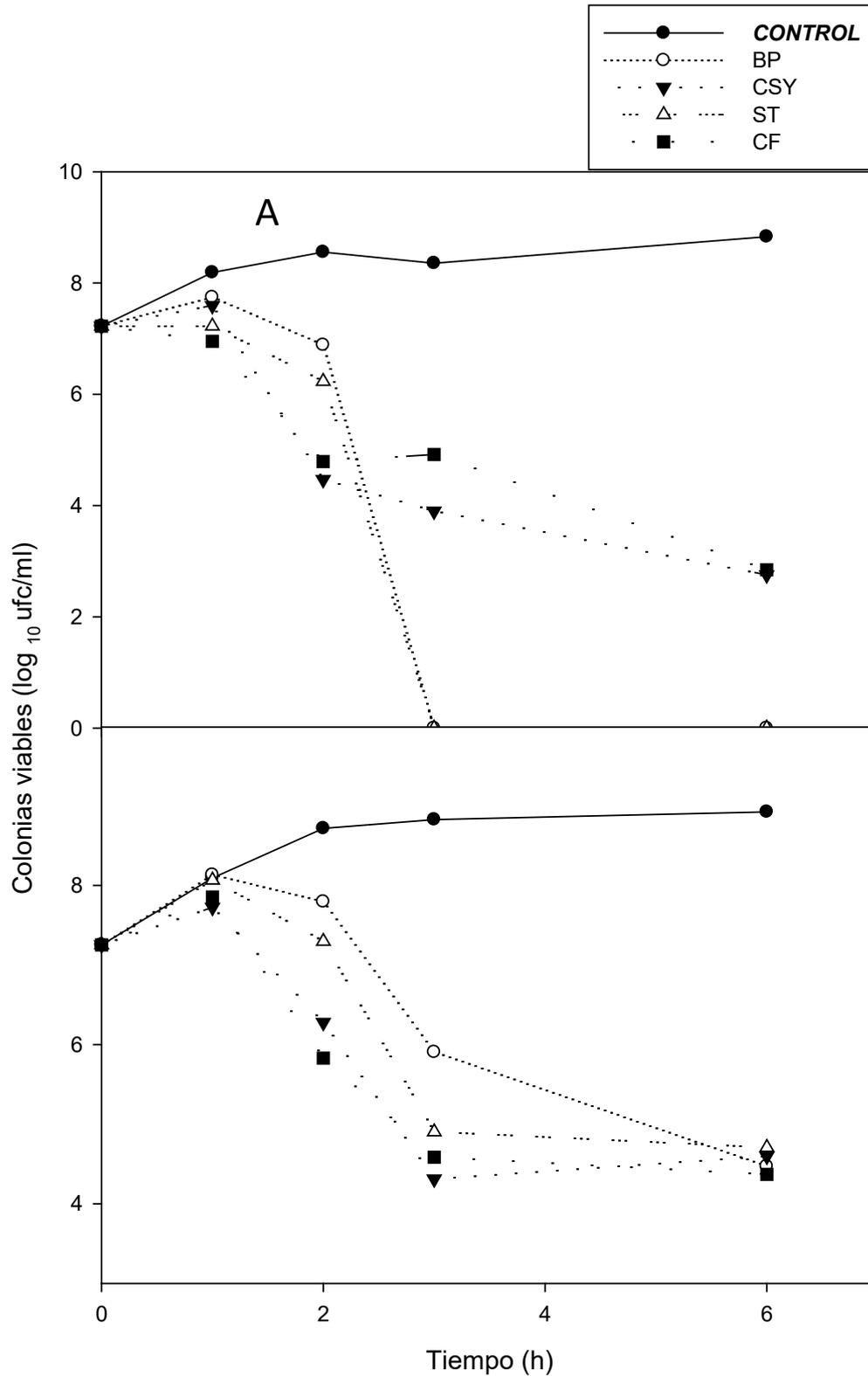


Figura 32: Cinética de crecimiento de *Escherichia coli* (A) y *Enterobacter aerogenes* (B) en cultivos mini-ubre: control (●) tras el tratamiento con cefalosporina (CF: ■), cefapirina (CSY: ▼), becilpenicilina (BP: ○) y dihidroestreptomocina (ST: △). Se representa el logaritmo en base 10 del recuento bacteriano expresado en unidades formadoras de colonias (UFC)/ml frente al tiempo. Los valores mostrados en la figura son la media de tres réplicas experimentales.

El tratamiento con BP o con ST provocó la reducción más drástica del crecimiento en los cultivos de *E. coli*, sin que se pudieran recuperar células bacterianas viables a partir de las tres horas tras la adición del antibiótico (Figura 32). Por su parte, el tratamiento con CF y CSY provocó una disminución más progresiva de los recuentos de esta especie bacteriana, con una tasa de supervivencia claramente superior a las seis horas del tratamiento.

En el caso de los cultivos de *E. aerogenes*, las tasas de supervivencia fueron más altas, en comparación con las observadas para *E. coli*. Estas tasas de supervivencia fueron similares, independientemente del tratamiento empleado, en el momento final del ensayo.

5.2.2- Cinética de liberación de endotoxinas

En una etapa preliminar se confirmó la idoneidad de la metodología empleada para la determinación de la concentración de endotoxinas en una matriz de leche, evaluando la liberación de endotoxinas inducida mediante la sonicación de los cultivos durante 15 minutos (Tablas 15 y 16).

<i>Escherichia coli</i>			
Dilución	UE/ml	UFC/ml	UE/UFC
-5	428	9,00 E+05	4,76 E-04
-4	1.462,1	9,10 E+06	1,61 E-04
-3	7.314,5	4,60 E+07	1,59 E-04
-2	15.822	6,50 E+07	2,43 E-04
-1	36.290	5,20 E+08	6,98 E-05

Tabla 15: Concentración bacteriana expresada como unidades formadoras de colonias (UFC)/ml y concentración de endotoxinas en unidades de endotoxina (UE)/ml tras la lisis bacteriana inducida por sonicación en cultivos mini-ubre de *Escherichia coli*. La relación entre actividad de endotoxina y el recuento bacteriano se expresa como UE/UFC.

<i>Enterobacter aerogenes</i>			
Dilución	UE/ml	UFC/ml	UE/UFC
-4	47,9	7,00 E+05	6,84 E-05
-3	164,7	1,50 E+07	1,10 E-05
-2	16.373	2,30 E+08	7,12 E-05
-1	88.800	1,60 E+09	5,55 E-05

Tabla 16: Concentración bacteriana expresada como unidades formadoras de colonias (UFC)/ml y concentración de endotoxinas en unidades de endotoxina (UE)/ml tras la lisis bacteriana inducida por sonicación en cultivos mini-ubre de *Enterobacter aerogenes*. La relación entre actividad de endotoxina y el recuento bacteriano se expresa como UE/UFC.

Para ambas especies bacterianas la concentración de endotoxina liberada (EU/ml) correlacionó con la concentración bacteriana expresada en unidades formadoras de colonia (UFC)/ml, con valores del coeficiente de correlación de Pearson de 0,951 ($p = 0,013$) y 0,999 ($p = 0,001$) respectivamente para *E. coli* y *E. aerogenes* (Figuras 33 y 34).

Concentración bacteriana

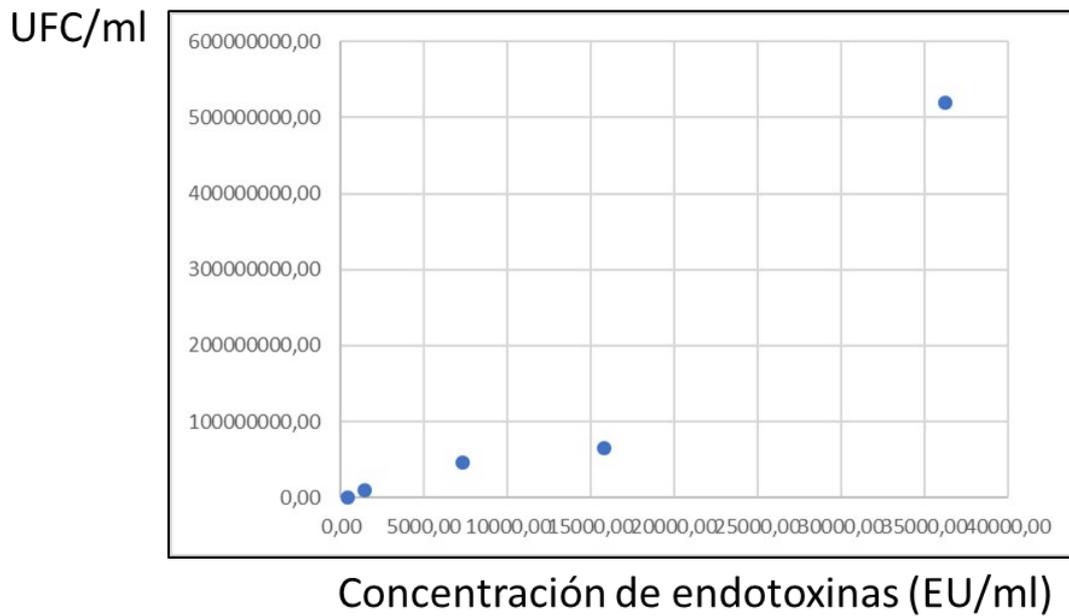


Figura 33: Correlación entre en la concentración de endotoxina obtenida tras el tratamiento de sonicación y la concentración bacteriana en cultivos mini-ubre de *Escherichia coli*.

Concentración bacteriana

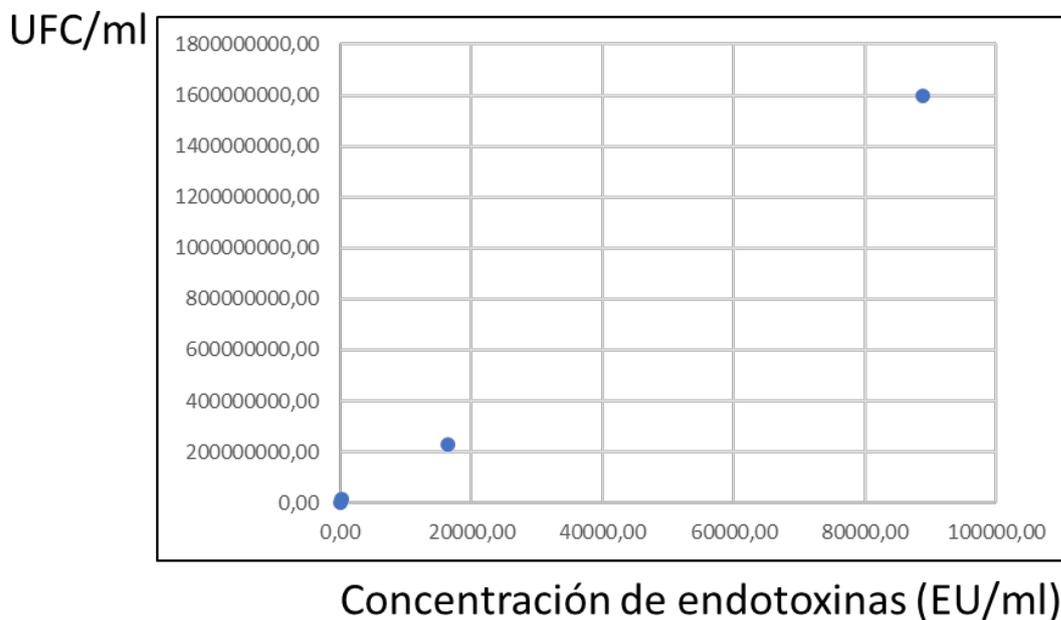


Figura 34: Correlación entre en la concentración de endotoxina obtenida tras el tratamiento de sonicación y la concentración bacteriana en cultivos mini-ubre de *Enterobacter aerogenes*.

Además, aunque los datos de endotoxina determinada tras el tratamiento por sonicación de los cultivos de *E. aerogenes* fueron ligeramente superiores en valor absoluto, cuando se relacionaron con los valores de concentración bacteriana en el cultivo (EU/UFC), el valor fue ligeramente inferior al de *E. coli* (Figura 35).

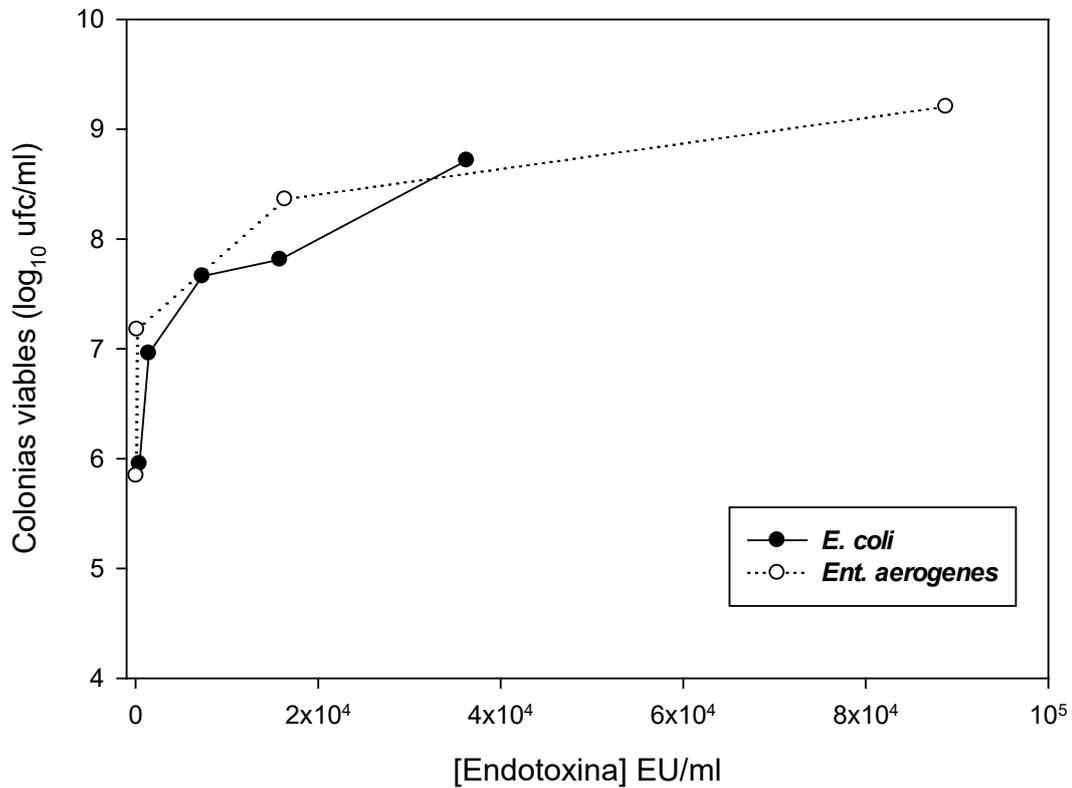


Figura 35: Relación entre la concentración de endotoxina (unidades de endotoxina (UE)/ml) y la concentración bacteriana expresada como unidades formadoras de colonia (UFC)/ml determinada tras el tratamiento por sonicación durante 15 minutos de cultivos mini-ubre de *Escherichia coli* (●) y *Enterobacter aerogenes* (○).

Los resultados obtenidos tras el tratamiento de los cultivos de leche con los diferentes antibióticos valorados se muestran en la Tabla 17 y Figura 36.

Ratio endotoxinas (UE)/UFC		
	<i>E. coli</i>	<i>E. aerogenes</i>
Control	1,04 E-05	1,16 E-06
Cefalosporina (CF)	2,54 E-04	9,74 E-05
Cefapirina (CSY)	3,23 E-04	5,13 E-05
Bencilpenicilina (BP)	1,94 E-04	2,99 E-05
Dihidroestreptomicina (ST)	5,99 E-05	2,04 E-05

Tabla 17: Concentración de endotoxina liberada (unidades de endotoxina (UE)/ml) en los cultivos de *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes* tras el tratamiento con cefalosporina (CF), cefapirina (CSY), bencilpenicilina (BP) y dihidroestreptomicina (ST) durante 6 horas. Para la determinación de la ratio EU/unidades formadoras de colonias (UFC) se tomaron los datos correspondientes a las EU/ml liberadas a tiempo final tras el tratamiento y el número de células bacterianas estimado como la diferencia entre el recuento en el punto máximo de crecimiento y al final del tratamiento. Los resultados mostrados son la media de tres réplicas experimentales.

Como se observa en la Figura 36 las cefalosporinas (CF y CSY) causaron los niveles más altos de liberación de endotoxinas para ambas especies bacterianas, seguidas por el tratamiento con BP. Por el contrario, el tratamiento con ST condujo a los niveles más bajos de endotoxinas. Como cabe esperar, las concentraciones de endotoxina más reducidas se observaron en los cultivos control sin tratamiento antibiótico.

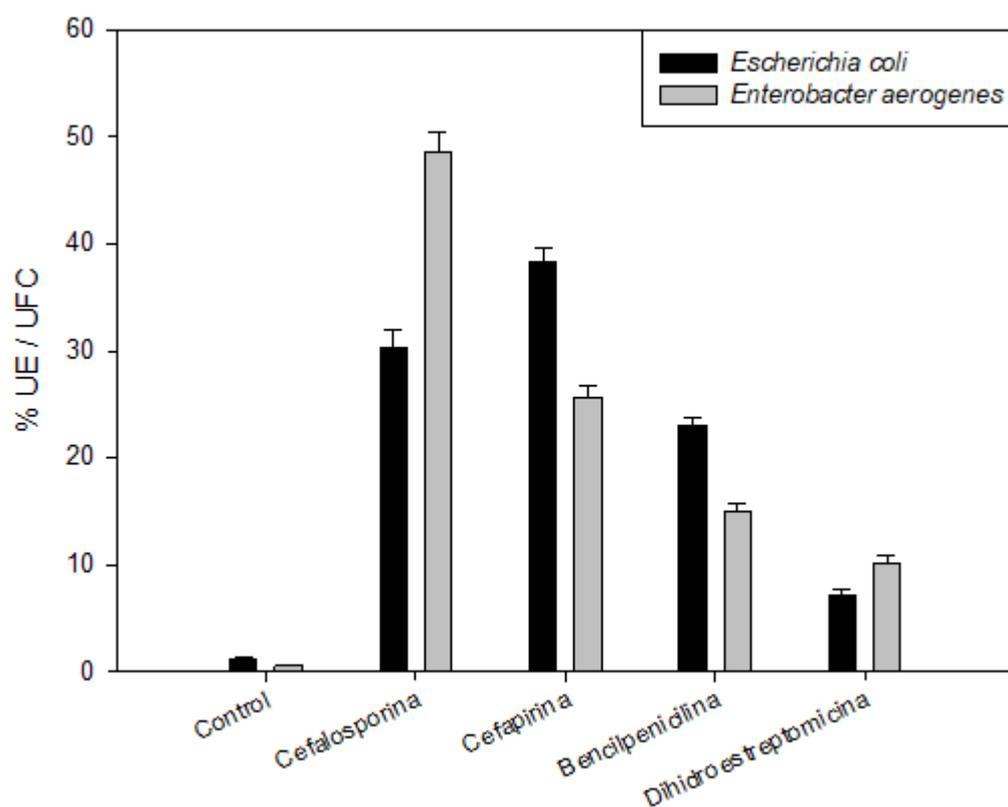


Figura 36: Porcentaje de liberación de endotoxinas en los cultivos de *Escherichia coli* (barras negras) y *Enterobacter aerogenes* (barras grises) tras el tratamiento con cefalosporina (CF), cefapirina (CSY), bencilpenicilina (BP) y dihidroestreptomocina (ST) tras la exposición al antibiótico durante 6 horas. Los resultados mostrados son la media de tres réplicas y expresados en porcentaje respecto al total de endotoxina procedente del sumatorio de endotoxinas liberadas en todos los tratamientos.

6- DISCUSIÓN

La mastitis bovina es una de las enfermedades que más pérdidas económicas ocasiona, tanto para el ganadero como para la industria láctea, con enormes repercusiones sobre los rendimientos de la explotación, sobre la calidad de la leche y sobre el bienestar animal. Cuando esta enfermedad está causada por bacterias Gram-negativas se ve, a su vez, agravada por la liberación de endotoxinas, fundamentalmente a consecuencia de la lisis bacteriana.

Esta liberación de endotoxinas es un factor de gran importancia en el curso de la enfermedad clínica de la mastitis asociada Gram negativos (Eckel y col., 2016; Sharun y col., 2021). Los niveles de endotoxinas liberados varían durante el curso de la enfermedad, pero también con el tratamiento antibiótico que, en función del mecanismo de acción, puede incrementar de forma significativa esta liberación. Por consiguiente, la identificación de los microorganismos implicados y, en particular, la discriminación entre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas es crucial en el manejo clínico de la mastitis del ganado vacuno lechero, permitiendo un enfoque adaptado de las estrategias de tratamiento.

Tradicionalmente, el diagnóstico de la mastitis asociada a bacterias Gram-negativas se ha basado en los signos clínicos y los resultados de los cultivos microbiológicos (Anri y col., 1989, Waage y col., 1994). Basándonos en la clasificación primaria de las mastitis en base a la presentación clínica, la inflamación del cuarterón afectado, acompañada de pirexia, anorexia, deshidratación y diarrea, junto con endotoxemia sistémica son los principales signos clínicos descritos en las presentaciones hiperagudas de las mastitis causadas por bacterias coliformes, mientras que en los casos agudos, la deshidratación y la diarrea no suelen aparecer (Anri y col., 1989).

Ahora bien, el diagnóstico basado únicamente en los signos clínicos puede inducir a error y son necesarios métodos microbiológicos o moleculares para confirmar las sospechas clínicas y para determinar el tratamiento más adecuado. Sin embargo, este diagnóstico requiere de tiempo y puede retrasar el inicio del tratamiento, con los riesgos que esto supone. En este contexto, la detección de endotoxinas en la leche se ha propuesto como una alternativa de gran interés para la aproximación diagnóstica en el manejo de las mastitis asociadas a bacterias Gram negativas (Waage y col., 1994; Suzuki y col., 2016).

Aunque existen varios métodos para la detección de endotoxinas, actualmente las pruebas basadas en el lisado de amebocitos de *Limulus* (*Limulus ameobocite lysate* o LAL) son las más extendidas debido a su alta sensibilidad analítica, su potencial de cuantificación y la fácil realización (Hurley col., 1995). Estas pruebas son seguras, rápidas y teóricamente podrían permitir discriminar entre las mamitis asociadas a bacterias Gram negativas y Gram positivas en pocas horas, permitiendo identificar e instaurar rápidamente el tratamiento más adecuado. Estas pruebas LAL podrían realizarse en sangre, pero parece mucho más adecuado realizarlas sobre muestras de leche en el diagnóstico precoz de la mamitis, ya que esta secreción puede contener niveles de endotoxinas hasta cinco veces superiores a los encontrados en la sangre (Anri y col., 1989).

Varios estudios han empleado pruebas LAL convencionales, como las basadas en la puntuación macroscópica de la fuerza del gel coagulado en muestras de leche al interaccionar con el lisado de amebocito (Anri y col., 1989; May y col., 1989; Waage y col., 1994; Svensson y Hahn-Hägerdal, 1987). Se trata de ensayos cualitativos o semicuantitativos, que se ven afectados por diversas condiciones ambientales y del laboratorio (Gehring y col., 2008). Más recientemente, otros autores han utilizado ensayos cromogénicos (Gehring, y col., 2008; Suzuki y col., 2016) o turbidimétricos (Mottar y col., 1993), igualmente basados en LAL, y adaptados a la matriz láctea. Estos métodos están reconocidos en las farmacopeas de Europa, EE.UU., Japón, China y otros países (Levin y col 1964) para la detección de actividad de endotoxinas en agua y productos farmacológicos. Sin embargo, y aunque existen directrices a nivel europeo para la detección de endotoxinas en matrices como el aire (EN, norma europea o *european norm* 14031:2021) o algunos nanomateriales (ISO, Organización Internacional de Normalización, del inglés *International Organization for Standardization* 29701:2010), así como investigaciones recientes que han empleado metodologías basadas en LAL para la detección de entotoxinas en leche, no se dispone en la actualidad de metodologías estandarizadas para la detección de esta actividad en muestras de leche (Wu y col., 2022; Sipka y col., 2015).

En relación a estos métodos, uno de los objetivos de esta investigación fue optimizar y validar un ensayo turbidimétrico cinético para la detección de endotoxinas en muestras de leche bovina a un coste asequible (aproximadamente 30-35 €/muestra) que permitiera su utilización tanto con fines de investigación como en el diagnóstico rutinario de la mamitis bovina.

La coloración de la leche y la presencia de sustancias interferentes son los principales retos que plantea el empleo de ensayos turbidimétricos en muestras de leche. A priori, sería plausible realizar diluciones que amortigüen el efecto del color y/o concentración de sustancias no deseadas para evitar estos efectos, tal y como se contempla para otras matrices, pero estas diluciones deben realizarse de modo que no supongan un riesgo para la validez del ensayo. En este sentido podemos destacar que, con respecto a la dilución de las muestras para minimizar el efecto del color y/o la concentración de sustancias no deseadas, la Real Farmacopea Española y Europea proporcionan una fórmula que permite calcular la máxima dilución permitida para las determinaciones en fármacos, en función de la posología y la vía de administración del producto. Siguiendo esta misma metodología otros investigadores han propuesto una dilución máxima para la detección de endotoxinas en heparina sódica mediante un ensayo gelificación con LAL (Burguet, y col., 2012). Sin embargo, no existe ninguna propuesta ni estudio previo con respecto a la dilución máxima que podría utilizarse para la detección de endotoxinas en la matriz láctea, habiéndose encontrado en la bibliografía previa un único proyecto de investigación llevado a cabo en 2015 y utilizando un ensayo turbidimétrico cinético en leche de vacas sanas que utilizó tres diluciones diferentes, 1/100, 1/200 y 1/400, obteniendo buenos resultados en la determinación de las endotoxinas sobre las muestras de leche ensayadas (Suzuki y col., 2016).

Teniendo en cuenta estos datos, en nuestra investigación decidimos utilizar dos diluciones diferentes, 1/500 y 1/1000 como diluciones de trabajo. A priori, estas diluciones permiten un rango de detección de 25 a 50.000 unidades de endotoxina (UE)/ml, garantizando que el ensayo pueda proporcionar resultados sobre muestras de leche que contengan un amplio rango de concentración de endotoxinas.

De manera complementaria, para evitar el efecto de sustancias interferentes potencialmente presentes en las muestras de leche, se evaluó un abordaje novedoso de pre-procesamiento de estas mediante filtración. Según la Farmacopea Europea, la filtración es uno de los métodos más comunes para eliminar las interferencias, aunque

algunos filtros, normalmente los de celulosa, pueden dar lugar a resultados falsos positivos debido a derivados celulósicos como los glucanos. En nuestro estudio, se utilizaron filtros con un tamaño de poro de 0,45 μm y fabricados con polivinilideno de fluoruro (PVDF) para filtrar todas las muestras de leche analizadas. Este material es muy inerte químicamente y suele utilizarse en condiciones que requieren una gran pureza (Salazar Macián, 2007; Guo-Dong y col., 2014). El efecto de esta filtración sobre la determinación se evaluó utilizando estándares de endotoxinas y agua libre de endotoxinas como control negativo o blanco. Los resultados obtenidos demostraron que la filtración a través de filtros de PVDF no afecta a los resultados de concentración de endotoxinas, produciendo además una reducción de la desviación entre réplicas o, dicho de otra manera, favorece una mayor homogeneización de las endotoxinas presentes en una solución.

Los estudios de validación del pre-procesamiento mediante filtración de PVDF, pusieron de manifiesto la ausencia de resultados falsos positivos. Además, demostraron que la variación de la actividad de endotoxina medida en los estándares filtrados y no filtrados es insignificante, aunque este valor fue ligeramente inferior en los patrones filtrados. El tiempo de reacción en las diez réplicas de cada patrón fue más homogéneo tras la filtración. Por consiguiente, la filtración a través de un filtro de PVDF se incluyó como pretratamiento rutinario de las muestras de leche, estándares y blancos en nuestro ensayo.

El ensayo turbidimétrico LAL utiliza una curva de calibración basada en estándares de referencia certificados para endotoxinas bacterianas que permiten la cuantificación. En el presente estudio hemos aceptado los mismos requisitos exigidos para el control de productos farmacológicos, definidos por el fabricante del lector de endotoxinas. En este sentido la linealidad aceptada viene determinada por un coeficiente de linealidad o R^2 superior a 0 para la curva de calibración, la variación entre réplicas de una misma muestra se limita con un porcentaje del coeficiente de variación inferior al 10 % y la recuperación de endotoxina en las muestras cebadas o *spike* con un patrón de endotoxina debe alcanzar un porcentaje de recuperación que oscile entre el 50 % y el 200 %.

Teniendo estos límites en cuenta, podemos destacar que la linealidad de las curvas obtenidas fue muy elevada, siendo en todos los casos superior a 0,995, hecho que demuestra la robustez del método. Por otro lado, la determinación de la tasa de recuperación en las muestras de leche enriquecidas o cebadas con una cantidad conocida de endotoxina para evaluar sustancias interferentes en la matriz de la leche, como se ha propuesto anteriormente (Suzuki y col., 2016), determinó que en nuestro estudio se cumplía este requisito en más del 95 % de las determinaciones realizadas en las muestras de leche, hecho que demuestra una adecuada sensibilidad y capacidad de recuperación de la técnica, así como la validez de la filtración a través de filtros de PVDF, tanto de los estándares como de las muestras procesadas.

Hasta donde los autores de este trabajo hemos podido conocer, no existe ninguna investigación o informe previo sobre la validación de ensayos turbidimétricos de LAL para la detección de endotoxinas en muestras de leche. Por ello, la primera parte de nuestro estudio se dedicó a establecer los valores de exactitud, incertidumbre, reproducibilidad y repetibilidad del método turbidimétrico LAL adaptado para la matriz leche. Esta validación del método se realizó siguiendo criterios nacionales, de la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC), e internacionales, normas ISO.

Los parámetros determinados en esta validación variaron en función de la actividad de endotoxinas de las muestras, un resultado esperable cuando se trata de la validación de un método de análisis que abarca un rango de concentraciones de detección particularmente amplio. Los mejores resultados se obtuvieron en el rango medio (0,5-5 EU/mL), mientras que empeoraron en los valores más elevados (50 EU/mL) y más bajos (0,5-5 EU/mL).

Además, para realizar el presente estudio ha sido necesario contar con una serie de muestras de leche diferentes fuentes y que permitiesen obtener valores de endotoxinas en todos los rangos del estudio. Así, se analizaron muestras de leche de animales con mamitis causadas por bacterias Gram negativas, con el fin de validar el método en los rangos altos y medios, leches procedentes de tanque de leche, con el fin de validar el método en el rango medio y bajo, y, por último, muestras de leche UHT (uperizada o del inglés *ultrahigh temperature*) comerciales, con el fin de validar la técnica LAL optimizada en el rango bajo o muy bajo de concentración de endotoxinas.

El método desarrollado fue capaz de discriminar claramente la mastitis causada por bacterias coliformes, proporcionando altas actividades de endotoxinas, de las mastitis causadas por bacterias Gram positivas, sin actividad de endotoxinas. Estos resultados confirman los hallazgos de una investigación previa en la que se utilizaron doce muestras de leche de vacas clínicamente afectadas de mastitis (Suzuki y col., 2016). Inesperadamente, no se detectó actividad de endotoxinas en una muestra de leche de una vaca con mastitis clínica atribuida a *Serratia marcescens*, una enterobacteria Gram negativa ocasionalmente involucrada en casos de mastitis en el ganado bovino. Este hallazgo puede ser consecuencia de un diagnóstico erróneo, pero también podría deberse a que en la leche objeto de estudio presentó un número relativamente bajo de bacterias (datos no mostrados). En este sentido, se ha descrito que las infecciones intramamarias por bacterias del género *Serratia* suelen asociarse a signos clínicos menos graves en comparación con otras bacterias Gram negativas (Schukken y col., 2012) y este hecho podría explicar el resultado inesperado de nuestro estudio. En cualquier caso, creemos que son necesarios más estudios con el fin de evaluar la utilidad del ensayo desarrollado en muestras de leche recogidas en animales con mastitis asociadas a diferentes géneros y especies de bacterias Gram negativas, diferentes de *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Enterobacter aerogenes* (*E. aerogenes*), las dos incluidas en los ensayos realizados en nuestra investigación.

El ensayo también fue capaz de medir la actividad de endotoxinas en la leche de tanque de explotación y en muestras comerciales de leche UHT. Las bacterias Gram negativas de la leche cruda son la principal fuente de endotoxinas en los productos lácteos y aunque los tratamientos térmicos pueden eliminar eficazmente las bacterias presentes en la leche, no son capaces de eliminar la endotoxina que es una molécula altamente estable a altas temperaturas, permitiendo mantener esta actividad de la endotoxina en los productos lácteos (Wu y col., 2021). Se ha demostrado que el número total de bacterias presentes en la leche cruda y la intensidad de los tratamientos térmicos son los principales determinantes de la actividad de endotoxinas en estos productos lácteos (Wu y col., 2022). En lo que respecta a la relevancia clínica o desde el punto de vista de la seguridad alimentaria de este hecho, se ha descrito que, aunque no hay pruebas claras de que la exposición oral a la endotoxina pueda causar malestar o enfermedad, si se ha demostrado en algunos estudios la existencia de un efecto sobre el tracto digestivo, tanto en humanos como en animales (Wu y col., 2021; Wu y col., 2022).

En resumen, nuestros resultados demuestran que el ensayo turbidimétrico de LAL desarrollado es un método robusto y estandarizado adecuado para la detección de endotoxinas en leche de vaca, tanto cruda como comercial. La dilución y la filtración de las muestras a través de filtros de PVDF evitan las interferencias asociadas a la matriz leche y permiten la detección de un amplio rango de actividades de endotoxinas.

En el caso de las mamitis del ganado bovino, aunque es necesario seguir investigando y evaluar su utilidad en los casos asociados a diferentes microorganismos Gram negativos, los resultados obtenidos demuestran la utilidad del ensayo optimizado para el diagnóstico rápido de mamitis por coliformes, así como en la elección del tratamiento más adecuado. En este sentido, la liberación de endotoxinas asociada a la lisis bacteriana es un factor determinante en el curso clínico de la enfermedad y debe tenerse en consideración al seleccionar el antibiótico para el tratamiento. Las endotoxinas son excelentes indicadores de infección activa, siendo muy adecuadas como marcadores para la fase aguda de la misma (Stromberg y col., 2017). Su importancia radica en que pueden interactuar con los receptores de membrana de algunas células del sistema inmunitario como neutrófilos y macrófagos, desencadenando la liberación de citocinas proinflamatorias como las interleucinas y el factor de necrosis tumoral alfa e induciendo inflamación (Wyckoff, y col., 1998). Los altos niveles de endotoxinas pueden causar una respuesta inmunitaria innata desproporcionada y perjudicial para el huésped, pudiendo provocar un agravamiento del estado general en los animales enfermos (Wyckoff y col., 2003, Eckel y col., 2016).

La cantidad de endotoxinas liberadas en el curso de la enfermedad varía en función del tratamiento antibiótico aplicado, dependiendo de si la acción de este antibiótico es bactericida o bacteriostática, de su modo de interacción con la bacteria o de su concentración, pudiéndose llegar a inducir una respuesta inflamatoria exacerbada con consecuencias clínicas a nivel local y sistémico (Jackson y col., 1996). Aunque se emplean de forma habitual tratamientos dirigidos a controlar esta reacción inflamatoria exacerbada en el manejo de las mamitis asociadas a bacterias Gram negativas (Caldeira y col., 2021), es importante investigar la liberación de endotoxinas inducida por diferentes manejos terapéuticos.

Desde el punto de vista de calidad de la leche, el ensayo turbidimétrico estandarizado LAL es una herramienta útil para investigar y, en su caso, minimizar la presencia de concentraciones significativas de endotoxinas en los productos lácteos. Este

hecho es de particular interés en el caso de la leche de fórmula destinada a la alimentación de lactantes. Se ha descrito que, dado que la estructura intestinal de los bebés no está completamente desarrollada, las endotoxinas residuales presentes en estas leches maternizadas pueden constituir una amenaza para la salud de los niños. Aunque no hay evidencias claras de que estas endotoxinas causen alteraciones inmunológicas significativas o enfermedad en los bebés, se ha propuesto que pueden alterar la microbiota intestinal, generando disbiosis, y que pueden inducir inflamación intestinal, obesidad o incluso sepsis, entre otros procesos (Wu y col., 2021). La técnica optimizada y validada en nuestra investigación podría ser de utilidad para evaluar la calidad de la leche de fórmula infantil y esta estrategia, unida a un control exhaustivo del origen y de la cadena de frío en todas las etapas, incluido el transporte y el almacenamiento, serían claves para asegurar productos infantiles de alta calidad para el crecimiento saludable de los recién nacidos.

Además, nuestros resultados avalan la posibilidad de adaptar las técnicas turbidimétricas LAL para la determinación de la actividad de endotoxina en otras matrices o substratos diferentes de la leche para la que se ha optimizado y validado en esta investigación. Entre algunos potenciales substratos de interés podemos destacar diferentes aditivos empleados en alimentación animal, particularmente algunos como aminoácidos y vitaminas que son producidos a través de la fermentación de algunas especies de bacterias Gram negativas como *E. coli* (Wallace y col., 2016). En este sentido, la presencia de altas concentraciones de endotoxina en la dieta se ha relacionado, en el caso del ganado porcino, con un impacto negativo en la morfología de las vellosidades intestinales, produciendo reducción tanto de la altura como del área de las vellosidades y un aumento en el ancho y profundidad de las glándulas intestinales (Parra-Blanco y col., 2011). Más aún, una investigación reciente ha cuantificado el efecto de la estimulación del sistema inmunitario mediante la exposición al lipopolisacárido (LPS) de *E. coli* sobre los requisitos energéticos de mantenimiento de los lechones (Huntley y col., 2017), demostrando que no se afectó el equilibrio de nitrógeno ni la digestibilidad de los nutrientes, pero aumentó la producción total de calor (19 %) y los requisitos de energía de mantenimiento (23 %), resultando en una disminución de la deposición de lípidos (-27 %) y de la ganancia media diaria (-26 %).

De forma similar, la optimización de técnicas de cuantificación de endotoxinas en matrices biológicas como por ejemplo muestras de plasma o suero podría tener interés

para el seguimiento del curso clínico y el diagnóstico precoz de procesos asociados a endotoxemia como pueden ser la laminitis, el desplazamiento abomasal, la acidosis ruminal, la metritis, el síndrome de muerte súbita de los novillos de engorde o el síndrome de boca mojada, entre otras enfermedades (Andersen, 2003).

Una vez validado el método de detección de endotoxinas en la matriz láctea se pasó a acometer el resto de objetivos específicos de este trabajo, la puesta a punto de un sistema *in vitro* para simular la infección por microorganismos Gram negativos en la ubre bovina y la evaluación del efecto de diferentes antibióticos, así como del género y especie en la liberación de endotoxinas y en la inhibición del crecimiento bacteriano.

Para alcanzar estos objetivos se desarrolló un sistema de cultivos en leche o cultivos mini-ubre con dos patógenos bacterianos Gram negativos, *E. coli* y *E. aerogenes*, un modelo de crecimiento bacteriano empleando leche como medio de cultivo y con una concentración de inóculo cercano a la infección real en la glándula mamaria sobre la que se valoró el efecto de la exposición a diferentes antibióticos, tanto β -lactámicos (dos cefalosporinas y bencilpenicilina) como un aminoglucósido (dihidroestreptomicina) sobre el crecimiento bacteriano y sobre la liberación de endotoxinas.

Nuestros resultados indican que el modelo de cultivos mini-ubre permite simular las condiciones de multiplicación en leche bovina de estas bacterias, así como estudiar el efecto asociado al tratamiento antibiótico, tanto en lo que respecta al crecimiento bacteriano como a la liberación de endotoxinas, con una aproximación mayor a condiciones reales que otros estudios llevados a cabo en medios de cultivo tradicionales (Crosby y col., 1994; Robert y col., 1993). De hecho y siempre buscando similitud con condiciones reales de infección, en el presente estudio se ha empleado una concentración de inóculo muy cercano a la infección en términos reales (10^7 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml), mientras que la mayoría de los ensayos realizados de forma habitual emplean concentraciones que oscilan entre 10^4 y 10^6 , claramente inferiores a los que se alcanzan de forma habitual en la infección real (Gould y col., 1997).

Las cefalosporinas y la bencilpenicilina son antibióticos pertenecientes al grupo de los β -lactámicos que, comúnmente, se usan para tratar infecciones de bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas (Bui y Preuss, 2023; Vardanyan y Hruby, 2006). Los antibióticos β -lactámicos constan de un anillo β -lactámico que constituye el núcleo esencial de la molécula, al cual se pueden unir estructuras adicionales (Kim y col., 2023).

Aunque cefalosporinas y penicilinas comparten la misma estructura de anillo β -lactámico, las cefalosporinas presentan un átomo adicional en el anillo lateral, siendo bien conocido que las modificaciones tanto en el anillo como en las cadenas laterales pueden conducir a alteraciones en la actividad microbiana o la farmacocinética (Harrison y Bratcher, 2008). La actividad antibacteriana de los β -lactámicos se basa en su parecido con la fracción terminal o dipéptico terminal D-Alanina-D-Alanina del pentapéptido del peptidoglicano, hecho que les permite imitar el enlace peptídico y el carboxilato terminal de d-Ala-d-Ala (Tooke y col., 2019). La reacción del anillo β -lactámico con la serina nucleófila de las proteínas de unión a penicilina o PBPs conduce a la apertura del anillo y a la acilación irreversible de estas proteínas de unión, evitando la formación de enlaces cruzados transpeptídicos de peptidoglicano y, consecuentemente inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana.

Por otra parte, la dihidroestreptomicina es un antibiótico aminoglucósido bactericida, activo frente a bacterias Gram negativas y también frente a algunas Gram positivas que basa su mecanismo primario de acción en la interferencia en la síntesis de proteínas, uniéndose a los ribosomas bacterianos y, por lo tanto, modificando su función (Wray y col., 2016).

Ha sido previamente demostrado que la exposición a diferentes tipos de antibióticos β -lactámicos puede generar diferentes respuestas morfológicas en las bacterias que, principalmente, se relacionan con los sitios de unión específicos para el anillo β -lactámico (Cornaglia y col., 1994). Estos sitios de unión son los conocidos como PBPs, proteínas de unión a la penicilina o *penicillin-binding proteins*, anteriormente mencionadas. La pared celular de las bacterias se encuentra reforzada por peptidoglucanos entrecruzados gracias a estas PBPs (Bui y Preuss, 2023), pero cuando los anillos β -lactámicos se unen a estas PBPs inhiben su actividad normal, produciendo la muerte de la bacteria al no poder sintetizar la pared celular. Existen tres principales respuestas a los antibióticos β -lactámicos por parte de las bacterias Gram negativas: la lisis celular rápida debido a la inhibición de las PBPs-1A y 1B, la producción de una pared celular deficiente que genera células redondas por la inhibición de la PBP-2 y, en tercer lugar, la generación de procesos de filamentación por la inhibición de la PBP-3. Particularmente, el fenotipo filamentoso consecuencia de la inhibición de la reticulación de la pared de peptidoglicano en el tabique de división se caracteriza por la acumulación en la célula bacteriana de grandes concentraciones de LPS, habiéndose asociado a ciertos

antibióticos β -lactámicos como la cefalexina, el aztreonam o la piperacilina. Además, puede ser que ciertos antibióticos causen la inhibición de varias de estas PBPs de manera simultánea, dependiendo de su concentración, así como del tamaño de inóculo, generando diferentes manifestaciones morfológicas y estructurales en la célula bacteriana (Gould y col., 1997).

En lo que respecta a la influencia del tamaño del inóculo y la fase de crecimiento del cultivo en el tipo de respuesta morfológica a los antibióticos β -lactámicos se ha descrito que las concentraciones relativas de PBPs 1A, 1B, 2 y 3 varían dependiendo en función del inóculo y de las condiciones de crecimiento (Maloun y col., 1991; Stevens y col., 1993). Por otro lado, la concentración del antibiótico también afecta a la saturación de las diferentes PBPs y, por lo tanto, influye sobre la respuesta morfológica de la célula bacteriana (Gould y col., 1997).

En nuestro estudio, trabajando en igualdad de concentración del inóculo y en idéntica fase de crecimiento, los cuatro antibióticos valorados provocaron una marcada reducción del crecimiento bacteriano a partir de las dos horas del tratamiento, tanto para los cultivos de *E. coli* como para los de *E. aerogenes*, confirmando su utilidad a la dosis empleada para inhibir el crecimiento bacteriano. Además, en el caso de *E. coli* tanto el tratamiento con bencilpenicilina como con dihidroestreptomicina generaron una inhibición completa de este crecimiento bacteriano tras tres horas de tratamiento. Estos resultados podrían ser consecuencia del mecanismo de acción de ambos antibióticos. En el caso de la dihidroestreptomicina, la interferencia en la síntesis proteica explicaría este resultado. Por su parte, las diferencias estructurales entre la bencilpenicilina y las cefalosporinas podrían ser determinantes para permitir la reducción total en el crecimiento de la cepa de *E. coli* empleada en el estudio.

Además, es importante mencionar que las curvas de supervivencia bacteriana fueron diferentes para las dos especies investigadas, siendo superiores las tasas de supervivencia de *E. aerogenes* en comparación con las de *E. coli* para los cuatro antibióticos investigados. Este hecho, en primer lugar, vuelve a poner de manifiesto la influencia de las diferencias tanto del modo de acción de los antibióticos como de diferencias estructurales intragrupalas sobre la inhibición del crecimiento bacteriano. En segundo lugar, confirma la estrecha relación genotipo-dependiente en la respuesta a los antibióticos mostrada por diferentes cepas y, finalmente, pone de manifiesto la importancia de llevar a cabo estudios de sensibilidad, bien con técnicas convencionales o

con técnicas como el cultivo mini-ubre, para la selección adecuada del tratamiento y para la monitorización de su efecto.

En lo que respecta a la liberación de endotoxinas, los resultados del presente trabajo nos permiten concluir que, para ambas especies de bacterias Gram negativas, el tratamiento con cefalosporinas se asoció a la generación de mayores concentraciones, todo ello a pesar de que el tratamiento con estos antibióticos no logró inhibir por completo el crecimiento bacteriano en los cultivos tratados. Con toda probabilidad este efecto está relacionado con los procesos de filamentación que se asocian al tratamiento con cefalosporinas y que generan una mayor concentración de endotoxinas en las células bacterianas de acuerdo a un cierto número de investigaciones (Gould y col., 1997; Schneier y col., 2020; Stromberg. y col., 2017; Tineke y col., 2013).

Centrándonos en los antibióticos β -lactámicos, las concentraciones empleadas en el presente trabajo inhibirían la PBP-3, produciendo la filamentación de las células bacterianas. Por tanto, se produciría una muerte celular más lenta, tal y como muestran las cinéticas de inhibición del crecimiento en el caso de *E. coli* para estos antibióticos, así como una mayor tasa de liberación de endotoxinas, hecho observado para ambas cepas y especies bacterianas investigadas. Por el contrario, el tratamiento con bencilpenicilina a la concentración aplicada en este estudio estaría asociada con la inhibición de las PBPs 1 y 2, provocando una lisis celular rápida. Este hecho explicaría la reducción drástica del crecimiento observada en los cultivos de *E. coli* a las 3 horas de la exposición a bencilpenicilina, así como las menores tasas de liberación de endotoxinas mostradas tanto para *E. coli* como para *E. aerogenes*.

Finalmente, el tratamiento con el aminoglucósido dihidroestreptomicina demostró ser la mejor opción entre las valoradas, combinando una actividad bactericida sobre un inóculo bacteriano con una concentración similar a la detectada en condiciones reales de infección de la glándula mamaria con los niveles más bajos de liberación de endotoxinas. Este hecho fue particularmente marcado en el caso de *E. coli* y fue, probablemente, consecuencia de una lisis celular rápida.

De forma global los resultados obtenidos con los cultivos mini-ubre demuestran la utilidad de este modelo experimental para la investigación detallada del efecto del tratamiento antibiótico en el manejo de las mamitis causadas por bacterias Gram negativas, particularmente cuando se trata de bacterias que se multiplican en la leche y tienen poca o nula capacidad de adhesión a las células de los acinis y conductos de la glándula mamaria como *E. coli*. La valoración de los resultados obtenidos con diferentes antibióticos, especies bacterianas o incluso cepas permitirá la optimización del manejo clínico de las mamitis asociadas a Gram negativos.

7- CONCLUSIONES

Primera

La validación intralaboratorial del ensayo turbidimétrico cinético en la matriz leche nos permite concluir que la técnica estandarizada es robusta y permite la detección válida y segura de un amplio rango de endotoxinas en muestras de leche, abarcando desde la detección en leches de animales afectados de mastitis clínica asociada a bacterias Gram negativas como *E. coli* a la detección en leche de tanque de explotaciones ganaderas o, incluso, en leche comercial UHT. Además, cabe destacar que esta técnica validada es rápida y tiene un coste relativamente bajo, hecho que la hace atractiva para su empleo en muy diferentes ámbitos.

.Segunda

La dilución y la filtración de las muestras de leche a través de filtros de PVDF permiten minimizar las interferencias asociadas a la matriz leche, tanto por su coloración como por la presencia de sustancias interfirientes, en la detección y cuantificación de endotoxinas. La incorporación de estas dos etapas en el procesado previo de las muestras ha permitido adaptar una técnica turbidimétrica cinética basada en la reacción de lisis de los amebocitos de *Limulus* o técnica LAL, diseñada para la detección de endotoxinas en aguas farmacológicas, para la detección sobre muestras de leche de muy diferentes orígenes

Tercera

La cuantificación de endotoxinas en muestras de leche permite el diagnóstico precoz de las mastitis causadas por bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* o *Enterobacter aerogenes*, sin necesidad de hacer cultivo microbiológico e identificación. Esta cuantificación aporta, además, información clínica relevante para el seguimiento de la evolución y el curso clínico de estas mastitis, así como para la monitorización de diferentes estrategias empleadas en su control.

Cuarta

La incorporación de muestras de leche comercial UHT en la validación de un ensayo turbidimétrico cinético para la cuantificación de endotoxinas nos ha permitido detectar concentraciones variables de endotoxinas en estas muestras. Aunque la relevancia de este hallazgo desde el punto de vista de la salud pública no está clara, creemos que es necesario ampliar este trabajo para evaluar la actividad de endotoxina en diferentes productos lácteos comerciales y, muy especialmente, en leches de fórmula maternizadas.

Quinta

Los cultivos mini-ubre realizados sobre leche permiten reproducir las condiciones de multiplicación de bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* o *Enterobacter aerogenes* en la glándula mamaria, alcanzando concentraciones bacterianas similares a las observadas en casos clínicos de mamitis en condiciones de campo. Combinado con técnicas de cultivo bacteriológico y técnicas de detección de endotoxinas, este modelo experimental permite monitorizar tanto el curso de la infección como el efecto sobre la multiplicación bacteriana y la liberación de endotoxinas de diferentes antibióticos.

Sexta

La utilización de cultivos mini-ubre de *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes* nos ha permitido demostrar que la cefalosporina y la cefapirina provocan una menor y más lenta inhibición del crecimiento bacteriano, así como una mayor liberación de endotoxinas que otros antibióticos betalactámicos como la bencilpenicilina, probablemente a consecuencia de fenómenos de filamentación de las células bacterianas. Por el contrario, el tratamiento con el aminogucósido dihidroestreptomicina combinó una elevada actividad bactericida con niveles bajos de liberación de endotoxinas, probablemente a consecuencia de una lisis celular rápida.

8- BIBLIOGRAFÍA

1. Aida Y, Pabst MJ. Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. *J Immunol Methods*. 1990 Sep 14;132(2):191-5.
2. Andersen PH. Bovine endotoxigenesis--some aspects of relevance to production diseases. A review. *Acta Vet Scand Suppl*. 2003;98:141-55. PMID: 15259787.
3. Anri, A. Detection of endotoxin in affected milk from cows with coliform mastitis. *Jpn. J. Vet. Sci*. 1989, 51, 847-848.
4. Anspach FB. Endotoxin removal by affinity sorbents. *J Biochem Biophys Methods*. 2001 Oct 30;49(1-3):665-81
5. Petsch, D. and Anspach, F.B. (2000) Endotoxin Removal from Protein Solutions. *Journal of Biotechnology*, 76, 97-119.
6. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00185-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00185-6)
7. Bach K., Somatic cell counts – Using the magic 200,000 cells/ml cut-point to diagnose subclinical mastitis. *PRO-DAIRY's The Manager*. 2018
8. Bannerman y col., 2005; Bannerman, D.D., Chockalingam, A., Paape, M.J., Hope, J.C. 2005. The bovine immune response during experimentally-induced *Pseudomonas aeruginosa* mastitis. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 107, 201-215.
9. Bannerman, D.D.; Paape, M.J.; Lee, J.W.; Zhao, X.; Hope, J.C.; Rainard, P. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*. 2004, 11, 463-472.
10. Bar, D., Grohn Y.T., Bennett G., Gonzalez R.N., Hertl, J.A., Schulte H.F., Tauer L.W., Welcome, F.L., Schukken Y.H. 2007. Effect of repeated episodes of generic clinical mastitis on milk yield in dairy cows. *J. Dairy Sci*. 90, 4643-4653.
11. Barnaud G, Benzerara Y, Gravisse J, Raskine L, Sanson-Le Pors MJ, Labia R, Arlet G. Selection during cefepime treatment of a new cephalosporinase variant with extended-spectrum resistance to cefepime in an *Enterobacter aerogenes* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Mar;48(3):1040-2. doi: 10.1128/AAC.48.3.1040-1042.2004. PMID: 14982805; PMCID: PMC353102.
12. Barnett MJ, Wadham JL, Jackson M, Cullen DC. In-Field Implementation of a Recombinant Factor C Assay for the Detection of Lipopolysaccharide as a Biomarker of Extant Life within Glacial Environments. *Biosensors (Basel)*. 2012 Mar 9;2(1):83-100.
13. Bhunia, A., Ramamoorthy, A., & Bhattacharjya, S. (2009). Helical Hairpin Structure of a Potent Antimicrobial Peptide MSI-594 in Lipopolysaccharide Micelles by NMR Spectroscopy. *Chemistry – A European Journal*, 15(9), 2036-2040. doi:10.1002/chem.200802635
14. Bornet C, Davin-Regli A, Bosi C, Pages J, Bollet C. 2000. Imipenem Resistance of *Enterobacter aerogenes* Mediated by Outer Membrane Permeability. *J Clin Microbiol* 38:. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.3.1048-1052.2000>
15. Bowman, G.L., Hueston, W.D., Boner G.J., Hurley, J.J., Andreas, J.E. 1986. *Serratia liquefaciens* mastitis in a dairy herd. *J. Am. Vet. Med. Assoc*. 189, 913-915.
16. Bradley, A.J. 2002. Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet. J*. 164, 116-128.
17. Bradley, A.J., Green, M.J. 2000. A study of the incidence and significance of intramammary enterobacterial infections acquired during the dry period. *J. Dairy Sci*. 83, 1957-1965.
18. Bradley, A.J., Green, M.J. 2001. Adaptation of *Escherichia coli* to the bovine mammary gland. *J. Clin. Microbiol*. 39, 1845-1849.
19. Bradley, A.J., Leach K.A., Breen J.E., Green, L.E., Green, M.J. 2007. Survey of the incidence y etiology of mastitis on dairy farms in Engly y Wales. *Vet. Rec*. 160, 253-257.

20. Brent, A. J. (2017). Sepsis. *Medicine*, 45(10), 649-653. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.07.010>
21. Brigham KL, Meyrick B. Endotoxin and lung injury. *Am Rev Respir Dis* 1986;133:913–27.
22. Brock T. D. (2019). Brock biology of microorganisms (Fifteenth). Pearson ; Pearson Education limited.
23. Bui T, Preuss CV. Cephalosporins. 2023 Mar 24. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan
24. Burguet, N.; Brito, L. Validación del método LAL para determinar endotoxinas bacterianas en el inyectable heparina sódica. *VacciMonitor* 2012, 21, 32–36.
25. Burvenich, C., Van Merris, V., Mehrzad, J., Diez-Fraile, A., Duchateau, L. 2003. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet. Res.* 34, 521-564.
26. Caldeira, M.O.; Bruckmaier, R.M.; Wellnitz, O. Effects of local or systemic administration of meloxicam on mammary gland inflammatory responses to lipopolysaccharide-induced mastitis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 2021, 104, 1039–1052.
27. Cartmell T, Poole S, Turnbull AV, y col. Circulating interleukin-6 mediates the febrileresponse to localised inflammation in rats. *J Physiol* 2000;526:653–61.
28. Chen, L., & Mozier, N. (2013). Comparison of *Limulus* amebocyte lysate test methods for endotoxin measurement in protein solutions. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 80, 180-185.
29. Chien S, Dellenback RJ, Usami S, y col. Blood volume and its distribution in endotoxic shock. *Am J Physiol* 1966;210:1411–8.
30. Cohen J, McConnell JS. Release of endotoxin from bacteria exposed to ciprofloxacin and its prevention with polymyxin B. *Eur J Clin Microbio* 1986; 5: 13-7.
31. Constable PD, Schmall LM, MuirWW, y col. Hemodynamic response of endotoxemic calves to treatment with small-volume hypertonic saline solution. *Am J Vet Res* 1991;52:981–9.
32. Cornaglia, G., Ligozzi, M., Bauernfeind, A., Satta, G. & Fontana, R. (1994). PBP binding and periplasmic concentration as determinants of the antibacterial activities of three new oral cephalosporins in *Escherichia coli*. *New Microbiologica* 17, 203–210.
33. Cornelis P (editor). (2008). *Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology* (1st ed. edición). Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-19-6 .
34. Crichton, P. B.; Old, D. C. (1 de noviembre de 1979). «Biotyping of *Escherichia coli*». *Journal of Medical Microbiology*, 12 (4): 473-486. ISSN 0022-2615. doi:10.1099/00222615-12-4-473
35. Crosby HA, Bion JF, Penn CW, Elliott TS. Antibiotic-induced release of endotoxin from bacteria in vitro. *J Med Microbiol.* 1994 Jan;40(1):23-30
36. Cullor, 1991; Cullor, J.S. 1991. Mamitis in dairy cows: Does it hinder reproductive performance?. *Vet. Med.* 86, 830-835.
37. Dawson, M. E. (1995). Choosing an LAL Test Method13 (3). Retrieved from https://www.acciusa.com/pdfs/newsletter/LAL_Vol.13No.3.pdf.
38. Deldar A, Naylor JM, Bloom JC. Effects of *Escherichia coli* endotoxin on leukocyte and platelet counts, fibrinogen concentrations, and blood clotting in colostrum-fed and colostrum-deficient neonatal calves. *Am J Vet Res* 1984;45:670–7.

39. Di R, Dinesh-Kumar SP, Miller WA. Translational frameshifting by barley yellow dwarf virus RNA (PAV serotype) in *Escherichia coli* and in eukaryotic cell-free extracts. *Molecular Plant-microbe Interactions: MPMI*. 1993 Jul-Aug;6(4):444-452.
40. Di Guardo, G., Battisti, A., Agrimi, U., Forletta, R., Reitano, M.E., Calderini, P. 1997. Pathology of *Serratia marcescens* mastitis in cattle. *Zentralbl Veterinarmed B*. 44, 537-546.
41. Ding JL, Navas MA 3rd, Ho B. Molecular cloning and sequence analysis of factor C cDNA from the Singapore horseshoe crab, *Carcinoscorpius rotundicauda*. *Mol Mar Biol Biotechnol*. 1995 Mar;4(1):90-103
42. Ding JL, Ho B. A new era in pyrogen testing. *Trends Biotechnol*. 2001 Aug;19(8):277-81.
43. Djabri, B., Bareille, N., Beaubeau, F., Seegers, H. 2002. Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta-analysis. *Vet. Res.* 33, 335-357.
44. Dodd, F.H., Neave, F.K. 1970. *Mamitis control biennial reviews*. National Institute Dairying Reading. UK.
45. Dolejš, P., & Vaňousová, K. (2015). A collection of horseshoe crabs (Chelicerata: Xiphosura) in the National Museum, Prague (Czech Republic) and a review of their immunological importance. *Arachnologische Mitteilungen*, 49, 1-9.
46. Döpfer, D., Barkema, H.W., Lam, T.J., Schukken, Y.H., Gaastra, W. 1999. Recurrent clinical mastitis caused by *Escherichia coli* in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82, 80-85.
47. Dullah, E. C., & Ongkudon, C. M. (2017). Current trends in endotoxin detection and analysis of endotoxin–protein interactions. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2), 251-261. doi:10.3109/07388551.2016.1141393
48. Eades SC. Endotoxaemia in dairy cattle: mechanism of reticulorumen stasis. *Vet J* 1997;153: 321–7.
49. Eckel, E.F.; Ametaj, B.N. Invited review: Role of bacterial endotoxins in the etiopathogenesis of periparturient diseases of transition dairy cows. *J. Dairy Sci.* 2016, 99, 5967–5990.
50. Elin, R. J., & Wolff, S. M. (1973). Nonspecificity of the *Limulus* Amebocyte Lysate Test: Positive Reactions with Polynucleotides and Proteins. *The Journal of Infectious Diseases*, 128(3), 349-352. doi:10.1093/infdis/128.3.349
51. Eng RH, Smith SM, Fan-Havard P, Ogbara T. Effect of antibiotics on endotoxin release from gram-negative bacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1993 Mar-Apr;16(3):185-9.
52. Erridge, C.; Bennett-Guerrero, E.; Poxton, I.R. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infect*. 2002, 4, 837–851.)
53. Erskine, R.J., Barlett, P.C., VanLente, J.L., Phipps, C.R. 2002. Efficacy of systematic ceftiofur as a therapy for severe clinical mastitis in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 85, 2571-2575.
54. Faull, W.B., Hughes, J.W. 1983. *Mamitis notes for the dairy practitioner*. Liverpool University Press. UK. 4^a Edition.
55. Ferguson, J.D., Azzaro, G., Gambina, M., Licitra, G. 2007. Prevalence of mastitis pathogens in Ragusa, Sicily, from 2000 to 2006. *J. Dairy Sci.* 90, 5798-5813.
56. Fujii, Hiroya & Noda, Kenichi & Asami, Yasuo & Kuroda, Akio & Sakata, Minoru & Tokida, Akihiko. (2007). Increase in bioluminescence intensity of firefly luciferase using genetic modification. *Analytical biochemistry*. 366. 131-6
57. Galanos C, Lüderitz O, Rietschel ET, Westphal O, Brade H, Brade L, Freudenberg M, Schade U, Imoto M, Yoshimura H, et al. Synthetic and natural *Escherichia coli*

- free lipid A express identical endotoxic activities. *Eur J Biochem.* 1985 1;148(1):1-5.
58. Gall, D., Nielsen, K., Yu, W., & Smith, P. (2006). Rapid, field-adapted indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies in bovine whole blood and serum to *Brucella abortus*. *Clin. Vaccine Immunol.*, 13(4), 501-506.
59. Gehring, U.; Spithoven, J.; Schmid, S.; Bitter, S.; Braun-Fahrländer, C.; Dalphin, J.C.; Hyvärinen, A.; Pekkanen, J.; Riedler, J.; Weiland, S.K.; et al. Endotoxin levels in cow's milk samples from farming and non-farming families—The PASTURE study. *Environ. Int.* 2008, 34, 1132–1136.
60. Giesecke, M. 1974. The diagnosis of subclinical mastitis in lactating cows. *J. South African Vet. Ass.* 45, 195-202.
61. Gimenes I, Caldeira C, Presgrave OA, de Moura WC, Villas Boas MH. Assessment of pyrogenic response of lipoteichoic acid by the monocyte activation test and the rabbit pyrogen test. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2015 Oct;73(1):356-60
62. Goldammer, T.; Zerbe, H.; Molenaar, A.; Schuberth, H.J.; Brunner, R.M.; Kata, S.R.; Seyfert, H.M. Mastitis increases mammary mRNA abundance of beta-defensin 5, toll-like-receptor 2 (TLR2), and TLR4 but not TLR9 in cattle. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2004, 11, 174–185.
63. Goodell EW, Fazio M, Tomasz A. Effect of benzylpenicillin on the synthesis and structure of the cell envelope of *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1978; 13: 514-26.
64. Gould IM, MacKenzie FM. The response of Enterobacteriaceae to beta-lactam antibiotics—'round forms, filaments and the root of all evil'. *J Antimicrob Chemother.* 1997 Oct;40(4):495-9
65. Gorbet MB, Sefton MV. Endotoxin: the uninvited guest. *Biomaterials.* 2005 Dec;26(34):6811-7
66. Guo-dong, K.; Yi-ming, C. Application and modification of poly(vinylidene fluoride) (PVDF) membranes—A review. 2014 *J. Membr.*
67. Haveri, M., Hovinen, M., Roslof, A., Pyörälä, S. 2008. Molecular types and genetic profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infection and extramammary sites. *J. Clin. Microbiol.* 46, 3728-3735.
68. Harrison C.J, MD, Bratcher D, DO* *Pediatrics in Review* Vol.29 No.8 August 2008 264-273.
69. Crosby H.A, Bion J. F., Penns C. W. , Elliott J. "Antibiotic-induced release of endotoxin from bacteria in vitro". *Med. Microbiol.* 1994; 40 (1): 23-30.
70. Heine H, Rietschel ET, Ulmer AJ. The biology of endotoxin. *Mol Biotechnol.* 2001 Nov;19(3):279-96
71. Hill, A.W., Shears, A.L., Hibbit, K.G. 1979. The pathogenesis of experimental *Escherichia coli* mastitis in newly calved dairy cows. *Res. Vet. Sci.* 26, 97-101.
72. Hirvonen, J., Eklund, K., Teppo, A.M., Huszenicza, G., Kulcsar, M., Saloniemi, H., Pyörälä, S. 1999. Acute phase response in dairy cows with experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. *Acta Vet. Scand.* 40, 35-46.
73. Hoe, F. G. H., & Ruegg, P. L. (2005). Relationship between antimicrobial susceptibility of clinical mastitis pathogens and treatment outcome in cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 227(9), 1461-1468. Retrieved Feb 15, 2024, from <https://doi.org/10.2460/javma.2005.227.1461>
74. Hoffmann, S., Peterbauer, A., Schindler, S., Fennrich, S., Poole, S., Mistry, Y., Van Aalderen, M. (2005). International validation of novel pyrogen tests based on human monocytoïd cells. *Journal of immunological methods*, 298(1-2), 161-173.
75. Hogan, J.S., Smith, K.L. 2003. Coliform mastitis. *Vet. Res.* 34, 507-519.

76. Hogan, J.S., Smith, K.L., Hoblet, K.H., Schoenberger, P.S., Todhunter, D.A., Hueston, W.D., Pritchard, D.E., Bowman, G.L., Heider, L.E., Brockett, B.L. 1989a. Bacterial counts in bedding materials used on nine commercial dairies. *J. Dairy Sci.* 72, 250-258.
77. Hogan, J.S.1, Smith, K.L. 1997. Bacteria counts in sawdust bedding. *J. Dairy Sci.* 80, 1600-1605.
78. Hogan, J.S.1, Todhunter, D.A., Smith, K.L., Schoenberger, P.S. 1989. Serum susceptibility of coliforms isolated from bovine intramammaryinfections. *J. Dairy Sci.* 72, 1893-1899.
79. Holst O, Brade H (1992) Chemical structure of the core region of lipopolysaccharides. In: Morrison DC, Ryan JL (eds) *Bacterial endotoxic lipopolysaccharides*, vol I. CRC Press, Boca Raton, pp 135–154
80. Homma JY, Matsuura M, Kumazawa Y. Structure-activity relationship of chemically synthesized nonreducing parts of lipid A analogs. *Adv Exp Med Biol.* 1990;256:101-19
81. Honeychurch J, Alduaij W, Azizyan M, Cheadle EJ, Pelicano H, Ivanov A, Huang P, Cragg MS, Illidge TM. Antibody-induced nonapoptotic cell death in human lymphoma and leukemia cells is mediated through a novel reactive oxygen species-dependent pathway. *Blood.* 2012 Apr 12;119(15):3523-33
82. Huang, Y.; Shen, L.; Jiang, J.; Xu, Q.; Luo, Z.; Luo, Q.; Yu, S.; Yao, X.; Ren, Z.; Hu, Y.; y col. Metabolomic Profiles of Bovine Mammary Epithelial Cells Stimulated by Lipopolysaccharide. *Sci. Rep.* 2019, 9, 19131.
83. Huijps, K., Lam, T.J., Hogeveen, H. 2008. Costs of mastitis: facts and perception. *J. Dairy Res.*75, 113-120.
84. Huntley, N. F., Nyachoti, C. & Patience, J. F., (2017) “Immune System Stimulation Increases Nursery Pig Maintenance Energy Requirements”, *Iowa State University Animal Industry Report* 14(1). doi: https://doi.org/10.31274/ans_air-180814-344
85. Hurley, S.C. Endotoxemia: Methods of detection and clinical correlates. *Clin. Microbiol. Rev. Am. Soc. Microbiol.* 1995, 8, 268–292.
86. I.D.F. 1987a. Bovine mamitis. Definition and guidelines for diagnosis. *Bulletin of the*
87. I.D.F. 1987b. Enviromental influences on bovine mamitis. *Bulletin of the International Dairy Federation* n° 217.

88. ISO 19036:2019, “Microbiología de la cadena alimentaria. Estimación de la incertidumbre de medición para determinaciones cuantitativas, como guías para los estudios estadísticos y evaluación de las técnicas de ensayo.
89. ISO 5725-1:1994, “Cálculo de exactitud (veracidad y precisión) de métodos de medición y resultados
90. Iwanaga, S. (2007). Biochemical principle of Limulus test for detecting bacterial endotoxins. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*, 83(4), 110-119. doi:10.2183/pjab.83.110
91. Jackson, J.J.; Kropp, H. Differences in mode of action of beta-lactam antibiotics influence morphology, LPS release and in vivo antibiotic efficacy. *J. Endotoxin. Res.* 1996, 3, 201–218.
92. Jackson,J.J , Kropp H, Difference in mode of beta-lactam antibiotics influence morphology, LPS reléase and in vitro antibiotic efficacy. *J Endotoxin Res* 1996;3 (3) 201-218)

93. Jackson, J.J., Kropp H, Difference in mode of beta-lactam antibiotics influence morphology, LPS release and in vitro antibiotic efficacy. *J Endotoxin Res* 1996;3 (3) 201-218).
94. Jacobson K.L, Cohen S.H, Inciardi J.F, King J.H, Lippert W.E, Iglesias T, VanCouverberghe C.J. The Relationship Between Antecedent Antibiotic Use and Resistance to Extended-Spectrum Cephalosporins in Group I β -Lactamase-Producing Organisms, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 21, Issue 5, November 1995, Pages 1107–1113, <https://doi.org/10.1093/clinids/21.5.1107>
95. Janda JM, Abbott SL: 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol* 2007, 45:2761-2764.
96. Jin, Y., Jia, J., Li, C., Xue, J., Sun, J., Wang, K.,... Liang, X. (2018). LAL test and RPT for endotoxin detection of CPT-11/DSPE-mPEG2000 nanoformulation: What if traditional methods are not applicable? *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(3), 289-296.
97. Joiner, T. J., Kraus, P. F., & Kupiec, T. C. (2002). Comparison of endotoxin testing methods for pharmaceutical products. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, 6, 408-409.
98. Kalmus, P., Asmäe, B., Kärssin, A., Orro, T., Kask, K. 2011. Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia. *Acta Vet. Scandinavica*. 53, 1-7.
99. Kamarudin, M.I., Fox, L.K., Gaskins, C.T., Gay, J.M. 1996. Environmental reservoirs for *Serratia marcescens* intramammary infections in dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 208, 555-558.
100. Kim D, Kim S, Kwon Y, Kim Y, Park H, Kwak K, Lee H, Lee JH, Jang KM, Kim D, Lee SH, Kang LW. Structural Insights for β -Lactam Antibiotics. *Biomol Ther (Seoul)*. 2023 Mar 1;31(2):141-147
101. Kim D, Kim S, Kwon Y, Kim Y, Park H, Kwak K, Lee H, Lee JH, Jang KM, Kim D, Lee SH, Kang LW. Structural Insights for β -Lactam Antibiotics. *Biomol Ther (Seoul)*. 2023 Mar 1;31(2):141-147.
102. Kobayashi, K.; Oyama, S.; Numata, A.; Rahman, M.M.; Kumura, H. Lipopolysaccharide disrupts the milk-blood barrier by modulating claudins in mammary alveolar tight junctions. *PLoS ONE* 2013, 8, e62187.
103. Kossaibati, M.A., Esslemont, R.J. 1997. The costs of production diseases in dairy herds in England. *Vet. J.* 154, 41-51.
104. Kovach NL, Yee E, Munford RS, Raetz CR, Harlan JM. Lipid IVA inhibits synthesis and release of tumor necrosis factor induced by lipopolysaccharide in human whole blood ex vivo. *J Exp Med.* 1990 Jul 1;172(1):77-84.
105. Kristula, M.A., Dou, A.Z., Toth, J.D., Smith, B.I., Harvey, N., Sabo, M. 2008. Evaluation of free-stall mattress bedding treatments to reduce mastitis bacterial growth. *J. Dairy Sci.* 91, 1885-1892.
106. Kulp, A.; Kuehn, M.J. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu. Rev. Microbiol.* 2010, 64, 163–184.
107. Kusser WC, Ishiguro EE. Effects of aminoglycosides and spectinomycin on the synthesis and release of lipopolysaccharide by *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32: 1247-50.
108. Lamy, T.J., Lipman, L.J., Schukken, Y.H., Gaastra, W., Brand, A. 1996. Epidemiological characteristics of bovine clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* studied by DNA fingerprinting. *Am. J. Vet. Res.* 57, 39-42.

109. Lannigan, R., Lawrence, L.E. 1989. Decreased susceptibility of *Serratia marcescens* to chlorhexidine related to the inner membrane. *J. Antimicrobiol. Chemother.* 15, 559-565.
110. Lee M Wetzler, *Immunology of Infectious Diseases* Edited by Stefan H. E. Kaufmann, Alan Sher, and Rafi Ahmed Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 2002. 520 pp., illustrated. \$105.95 (cloth), *Clinical Infectious Diseases*, Volume 35, Issue 4, 15 August 2002, Pages 499–500, <https://doi.org/10.1086/341421>
111. Levin, J., & Bang, F. (1968). Clottable Protein in *Limulus*: Its Localization and Kinetics of Its Coagulation by Endotoxin. *Thrombosis et diathesis haemorrhagica*, 19, 186-197. doi:10.1055/s-0038-1651195.
112. Levin, J.; Bang, F.B. The roll of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 1964, 115,265–274.
113. Liang YC, Liu HJ, Chen SH, y col. Effect of lipopolysaccharide on diarrhea and gastrointestinal transit in mice: roles of nitric oxide and prostaglandin E2. *World J Gastroenterol* 2005;11. 357–61.
114. Lindsay GK, Roslansky PF, Novitsky TJ. Single-step, chromogenic *Limulus* amoebocyte lysate assay for endotoxin. *J Clin Microbiol.* 1989 May;27(5):947-51. doi: 10.1128/jcm.27.5.947-951.1989.
115. Loppnow H, Libby P, Freudenberg M, Krauss JH, Weckesser J, Mayer H. Cytokine induction by lipopolysaccharide (LPS) corresponds to lethal toxicity and is inhibited by nontoxic *Rhodobacter capsulatus* LPS. *Infect Immun.* 1990 Nov;58(11):3743-50
116. Lüderitz, O., Freudenberg, M., Galanos, C., Lehmann, V., Rietschel, E. T., and Shaw, D. (1982) Lipopolysaccharides of gram-negative bacteria. *Reviews of Infectious Diseases.* 6 (4): 428-431
117. Magalhães PO, Lopes AM, Mazzola PG, Rangel-Yagui C, Penna TC, Pessoa A Jr. Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review. *J Pharm Pharm Sci.* 2007;10(3):388-404
118. Makovec, J.A., Ruegg, P.L. 2003. Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. *J. Dairy Sci.* 86, 3466-3472.
119. Maloney, T., Phelan, R., & Simmons, N. (2018). Saving the horseshoe crab: A synthetic alternative to horseshoe crab blood for endotoxin detection. *PLoS biology*, 16(10), e2006607.
120. Maloun, F., Chamberland, S., Brochu, N. & Parr, T. R. (1991). Influence of growth media on *Escherichia coli* cell composition and ceftazidime susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35, 477–83.
121. Mani, V.; Weber, T.E.; Baumgard, L.H.; Gabler, N.K. Growth and Development Symposium: Endotoxin, inflammation, and intestinal function in livestock. *J. Anim. Sci.* 2012, 90, 1452–1465.
122. Manoharan H, Kalita P, Gupta S, Sai VVR. Plasmonic biosensors for bacterial endotoxin detection on biomimetic C-18 supported fiber optic probes. *Biosens Bioelectron.* 2019 Mar 15; 129:79-86.
123. Mansor, N.N.; Leong, T.T.; Safitri, E.; Futra, D.; Ahmad, N.S.; Nasuruddin, D.N.; Itnin, A.; Zaini, I.Z.; Arifin, K.T.; Heng, L.Y.; et al. An Amperometric Biosensor for the Determination of Bacterial Sepsis Biomarker, Secretory Phospholipase Group 2-IIA Using a Tri-Enzyme System. *Sensors* 2018, 18, 686.
124. Marco, J.C.; Rodríguez, M., González, M., Ziluaga, I., Salazar, L.M., Palomino, A., Méndez, A., Díaz, A., Fernández, G. 1998. Mamitis bovina y calidad de la leche

- (I), Etiología de las mamitis bovinas en España. Bovis nº85, Grupo Luzán 5, Madrid, 13-31.
125. Mares, J., Kumaran, S., Gobbo, M., & Zerbe, O. (2009). Interactions of lipopolysaccharide and polymyxin studied by NMR spectroscopy. *The Journal of biological chemistry*, 284(17), 11498-11506. doi:10.1074/jbc.M806587200.
126. May, S.A.; Mikolajcik, E.M.; Richter, E.R. Conventional tube and microplate *Limulus* amoebocyte lysate procedures for determination of gram-negative bacteria in milk. *J. Dairy Sci.* 1989, 72, 1137–1141.
127. Morita, T., Tanaka, S., Nakamura, T., & Iwanaga, S. (1981). A new (1 → 3)- β -D-glucan-mediated coagulation pathway found in *limulus* ameocytes. *FEBS Letters*, 129(2), 318-321. doi:https://doi.org/10.1016/0014-5793(81)80192-5
128. Morrison DC, Antibiotic- Mediated realice of endotoxine and the pathogenesis of gram-negative sepsis. *Progress in Clinical and Biological Res* 1996; 397: 199-207.
129. Mottar, J.; de Block, J.; Merchiers, M.; Vantomme, K.; Moermans, R. Routine *limulus* amoebocyte lysate (LAL) test for endotoxin determination in milk using a Toxinometer ET-201. *J. Dairy Res.* 1993, 60, 223–228.
130. Muellner, P., Zadoks, R.N., Perez, A.M., Spencer, S.E., Schukken, Y.H., French, N.P. 2011. The integration of molecular tools into veterinary and spatial epidemiology. *Spatial Spatiotemporal Epidemiol.* 2, 159 -171.
131. Munoz, M.A., Ahlström, C., Rauch, B.J., Zadoks, R.N. 2006. Fecal shedding of *Klebsiella pneumoniae* by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89, 3425-3430.
132. Munoz, M.A.1, Zadoks, R.N. 2007. Short communication: Patterns of fecal shedding of *Klebsiella* by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90, 1220-1224.
133. Muta, T., Miyata, T., Misumi, Y., Tokunaga, F., Nakamura, T., Toh, Y. Iwanaga, S. (1991). *Limulus* factor C. An endotoxin-sensitive serine protease zymogen with a mosaic structure of complement-like, epidermal growth factor-like, and lectin-like domains. *Journal of Biological Chemistry*, 266(10), 6554-6561.
134. Nakamura, T., Morita, T., & Iwanaga, S. (1986). Lipopolysaccharide-sensitive serine-protease zymogen (factor C) found in *Limulus* hemocytes. *European Journal of Biochemistry*, 154(3), 511-521. doi:10.1111/j.1432-1033.1986.tb09427.x
135. Nam, H.M.1, Kim, J.M., Lim, S.K., Jang, K.C., Jung, S.C. 2010. Infectious aetiologies of mastitis on Korean dairy farms during 2008. *Res. Vet. Sci.* 88, 372-374.
136. Nankar, S.A.; Pande, A.H. Physicochemical properties of bacterial pro-inflammatory lipids influence their interaction with apolipoprotein-derived peptides. *Biochim. Biophys. Acta* 2013, 4, 853–862.
137. Nemeth, J., Muckle, C.A., Gyles, C.L. 1994. In vitro comparison of bovine mastitis y fecal *Escherichia coli* isolates. *Vet. Microbiol.* 40, 231-238.
138. Netea, M.G.; van Deuren, M.; Kullberg, B.J.; Cavaiillon, J.M.; Van der Meer, J.W. Does the shape of lipid A determine the interaction of LPS with Toll-like receptors? *Trends Immunol.* 2002, 23, 135–139
139. Neun, B.W., Cedrone, E., Potter, T.M., Crist, R.M. y Dobrovolskaia, M.A., "Detection of Beta- Glucan Contamination in Nanotechnology- Based Formulations", *Molecules*. Agosto de 2020; 25(15): 3367, publicado en línea el 24 de julio de 2020. doi: 10.3390/molecules25153367.
140. Newman, L.E., Kowalski, J.J. 1973. Fresh sawdust bedding - a possible source of *Klebsiella* organisms. *Am. J. Vet. Res.* 34, 979-980.

141. Noda K, Goto H, Murakami Y, Ahmed AB, Kuroda A. Endotoxin assay by bioluminescence using mutant firefly luciferase. *Anal Biochem.* 2010 Feb 15;397(2):152-5.
142. Ohtsuka, H.; Kudo, K.; Mori, K.; Nagai, F.; Hatsugaya, A.; Tajima, M.; Tamura, K.; Hoshi, F.; Koiwa, M.; Kawamura, S. Acute phase response in naturally occurring coliform mastitis. *J. Vet. Med. Sci.* 2001, 63,675–678.
143. Olson NC, Brown TT. Effects of endotoxemia on lung water and hemodynamics in conscious calves. *Am J Vet Res* 1985;46: 711–8.
144. Ong, K. G., Leland, J. M., Zeng, K., Barrett, G., Zourob, M., & Grimes, C. A. (2006). A rapid highly-sensitive endotoxin detection system. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(12), 2270-2274.
145. Ongkudon CM, Hodges E, Murphy K, Danquah MK. Removal of endotoxins from plasmid DNA: analysis of aggregative interaction of mobile divalent metal cations with endotoxins and plasmid DNA. *J Sep Sci.* 2012 Nov;35(22):3208-16.
146. Ostronoff CS, Lourenço FR. Measurement Uncertainty of Chromogenic LAL Assays: Reaction Time and Proportion of Endotoxin and LAL Reagent Affect Release of p-Nitroaniline. *J AOAC Int.* 2015 Jan-Feb;98(1):51-5
147. Paape, M.J.; Bannerman, D.D.; Zhao, X.; Lee, J.W. The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Vet. Res.* 2003, 34, 597–627.
148. Parra-Blanco, A., Nicolas, D., Arnau, M.R., Gimeno-Garcia, A.Z., Rodrigo, L. and Quintero, E., 2011. Gastric endoscopic submucosal dissection assisted by a new traction method: the clip-band technique. A feasibility study in a porcine model (with video). *Gastrointestinal endoscopy*, 74(5), pp.1137-1141.
149. Paul, I. E., Raichur, A. M., Chandrasekaran, N., & Mukherjee, A. (2016). Fluorometric sensing of endotoxin based on aggregation of CTAB capped gold nanospheres. *Journal of Luminescence*, 178, 106-114.
150. Paulin-Curlee, G.G., Singer, R.S., Sreevatsan S., Isaacson, R., Reneau, J., Foster, D., Bey, R. 2007. Genetic diversity of mastitis-associated *Klebsiella pneumoniae* in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90, 3681-3689.
151. Peeler, E.J., Green, M.J., Fitzpatrick, J.L., Green, L.E. 2003. The association between quarter somatic-cell counts and clinical mastitis in three British dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 59, 169- 180.
152. Petsch, D. and Anspach, F.B. (2000) Endotoxin Removal from Protein Solutions. *Journal of Biotechnology*, 76, 97-119.
153. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00185-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00185-6)
154. Petzl, W.; Günther, J.; Pfister, T.; Sauter-Louis, C.; Goetze, L.; von Aulock, S.; Hafner-Marx, A.; Schuberth, H.J.; Seyfert, H.M.; Zerbe, H. Lipopolysaccharide pretreatment of the udder protects against experimental *Escherichia coli* mastitis. *Innate Immun.* 2012, 18, 467–477.
155. Pfaller M.A, Herwaldt L.A, The Clinical Microbiology Laboratory and Infection Control: Emerging Pathogens, Antimicrobial Resistance, and New Technology, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 25, Issue 4, October 1997, Pages 858–870, <https://doi.org/10.1086/515557>
156. Pfeiffer, R. (1892) Untersuchungen über das Cholera Gift. *Zf.f. Hygiene* 11, 393–412.
157. Philpott (1984) Philpot, W. N. 1984. Economics of mastitis control. *Vet. Clin. North Am. -Large Animal Practice* 6, 233-245.
158. Piepers y col., 2007 Piepers, S., De Meulemeester, L., De Kruijff, A., Opsomer, G., Barkema, H.W., De Vlieghe, S. 2007. Prevalence y distribution of mastitis

- pathogens in subclinically infected dairy cows in Flyers, Belgium. *J. Dairy Res.* 74, 478-483.
159. Pillai, S.R., Kunze, E., Sordillo, L.M., Jayarao, B.M. 2001. Application of differential inflammatory cell count as a tool to monitor udder health. *J. Dairy Sci.* 84, 1413-1420.
160. Pitkälä, A., Haveri, M., Pyörälä, S., Myllys, V., Honkanen-Buzalski, T. 2004. Bovine mastitis in Finland 2001--prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *J. Dairy Sci.* 87, 2433-2441.
161. Podschun R, Ullmann U (1998). «Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors». *Clin Microbiol Rev* 11 (4): 589-603. PMID 9767057
162. Poutrel, B. 1985, Généralités sur les mammites de la vache laitière. Processus infectieux, épidémiologie, diagnostic, méthodes de contrôle. *Rec. Méd. Vet.* 161, 497-511.
163. Priano G, Pallarola D, Battaglini F. Endotoxin detection in a competitive electrochemical assay: synthesis of a suitable endotoxin conjugate. *Anal Biochem.* 2007 Mar 1;362(1):108-16
164. Pyörälä, S., Kaartinen, L., Käck, H., Rainio, V. 1994. Efficacy of two therapy regimes for treatment of experimentally induced *Escherichia coli* mastitis in the bovine. *J. Dairy Sci.* 77, 453-461.
165. Qureshi, N., Takayama, K., and Kurtz. R. (1991) Diphosphoryl lipid A obtained from the nontoxic lipopolysaccharide of *Rhodopseudomonas sphaeroides* is an endotoxin antagonist in mice. *Infect. Immun.* 59, 441-444.
166. Reynolds SJ, Thorne PS, Donham KJ, Croteau EA, Kelly KM, Lewis D, Whitmer M, Heederik DJ, Douwes J, Connaughton I, Koch S, Malmberg P, Larsson BM, Milton DK. Comparison of endotoxin assays using agricultural dusts. *AIHA J (Fairfax, Va).* 2002 Jul-Aug;63(4):430-8
167. Rietschel, E. T. and Brade, H. (1992) Bacterial endotoxins. *Sci. Am.* 267, 54-61.
168. Rietschel, E. T., Brade, H., Brade, L., Kaca, W., Kawahara, K., Lindner, B., Luderitz, T., Tomita, T., Schade, U., and Seydel. U. (1985) Newer aspects of the chemical structure and biological activity of bacterial endotoxins. *Prog Clin Biol Res.* 189:31-51.
169. Rietschel, E. T., Brade, H., Holst, O., et al. (1996) Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 216, 39-81.
170. Roberson, J.R., Warninck, L.D., Moore, G. 2004. Mild to moderate clinical mastitis: efficacy of intramammary amoxicillin, frequent milk-out, a combined intramammary amoxicillin and frequent milk-out treatment versus no treatment. *J. Dairy Sci.* 87, 583-592.
171. Robert H.K. Eng, Sharon M. Smith, Patty Fan-Havard, and Tajudeen Ogbara. Effect of Antibiotics on Endotoxin Release from Gram-Negative Bacteria 1993 16 (3): 185-189.
172. Rosenthal KS, Swanson PE, Form DR. Disruption of *Escherichia coli* outer membranes by EM 49. A new membrane active peptide. *Biochemistry* 1976; 15: 5783-92.
173. Rusmin S, DeLuca PP. Effect of antibiotics and osmotic change on the release of endotoxin by bacteria retained on intravenous inline filters. *Am J Hosp Pharm* 1975; 32: 378- 80

174. Saad AM, Ostensson K. Flow cytofluorometric studies on the alteration of leukocyte populations in blood and milk during endotoxin-induced mastitis in cows. *Am J Vet Res* 1990; 51: 1603–7.
175. Saiki I, Maeda H, Murata J, Takahashi T, Sekiguchi S, Kiso M, Hasegawa A, Azuma I. Production of interleukin 1 from human monocytes stimulated by synthetic lipid A subunit analogue. *Int J Immunopharmacol*. 1990;12(3):297-305
176. Sakai, H., Hisamoto, S., Fukutomi, I., Sou, K., Takeoka, S., & Tsuchida, E. (2004). Detection of lipopolysaccharide in hemoglobin-vesicles by *Limulus* amoebocyte lysate test with kinetic-turbidimetric gel clotting analysis and pretreatment of surfactant. *Journal of pharmaceutical sciences*, 93(2), 310-321.
177. Salazar Macián, R. *Cualificación y Validación: Elementos Básicos de la Calidad y Productividad*; Salazar-Macián, R., Ed.; ROMARGRAF, Hospitalet de Llobregat: Barcelona, Spain, 2007; pp. 234–237.
178. Sambrook J, Russel DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
179. Sampimon, O.C., Barkema, H.W., Berends, I.M.G.A., Sol, J., Lam, T.J.G.M. 2009. Prevalence of intramammary infection in Dutch dairy herds. *J. Dairy Res.* 76, 129-136.
180. Sampimon, O.C., Sol, J., Kock, P.A. 2006. Een uitbraak van *Klebsiella pneumoniae* mastitis. *Tijdschr Diergeneeskd.* 131, 2-4.
181. Sandle, T. PhD., "Pharmaceutical Product Impurities: Considering Beta Glucans", *American Pharmaceutical Review*. 31 de agosto de 2013, adición en línea.
182. Schaumberger S., y Reisinger N., 2016. Science & Solutions. Micotoxinas 751. BM Editores.1.-Gerente de Producto, Gestión de Riesgos de Micotoxinas.2.-Directora de Proyecto, Endotoxinas. www.biomin.net.
183. Schepers, A.J., Lam, T.J., Schukken, Y.H., Wilmink, J.B., Hanekamp, W.J. 1997. Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters. *J. Dairy Sci.* 80, 1833-1840.
184. Schindler, S., Spreitzer, I., Löschner, B., Hoffmann, S., Hennes, K., Halder, M. Montag, T. (2006). International validation of pyrogen tests based on cryopreserved human primary blood cells. *Journal of immunological methods*, 316(1), 42-51. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jim.2006.07.023>
185. Schneier M, Razdan S, Miller AM, Briceno ME, Barua S. Current technologies to endotoxin detection and removal for biopharmaceutical purification. *Biotechnol Bioeng.* 2020 Aug;117(8):2588-2609.
186. Schrick, F.N., Hockett, M.E., Saxton, A.M., Lewis, M.J., Dowlen, H.H., Oliver, S.P. 2001. Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. *J. Dairy Sci.* 84, 1407-1412.
187. Schukken, Y.; Chuff, M.; Moroni, P.; Gurjar, A.; Santisteban, C. Welcome, F.; Zadoks, R. The "other" gram-negative bacteria in mastitis: *Klebsiella*, *serratia*, and more. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* 2012, 28, 239–256.
188. Schukken, Y.H., Bennett, G.J., Zurakowski, M.J., Sharkey, H.L., Rauch, B.J., Thomas, M.J., Ceglowski, B., Saltman, R.L., Belomestnykh, N., Zadoks, R.N. 2011. Randomized clinical trial to evaluate the efficacy of a 5-day ceftiofur hydrochloride intramammary treatment on nonsevere gram-negative clinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 94, 6203-6215.
189. Schwarz, H., Gornicec, J., Neuper, T., Parigiani, M. A., Wallner, M., Duschl, A., & Horejs-Hoeck, J. (2017). Biological activity of masked endotoxin. *Scientific Reports*, 7(1), 44750. doi:10.1038/srep44750.

190. Sharun, K.; Dhama, K.; Tiwari, R.; Gugjoo, M.B.; Iqbal-Yattoo, M.; Patel, S.K.; Pathak, M.; Karthik, K.; Khurana, S.K.; Singh, R.; et al. Advances in therapeutic and managemental approaches of bovine mastitis: A comprehensive review. *Vet. Q.* 2021, 41,107–136.
191. Sheikh, Sonia & Blaszykowski, Christophe & Romaschin, Alex & Thompson, Michael. (2016). Endotoxin detection in full blood plasma in a theranostic approach to combat sepsis. *RSC Adv.* 6. 38037-38041. 10.1039/C6RA02745H.
192. Sipka, S.; Béres, A.; Bertók, L.; Varga, T.; Bruckner, G. Comparison of endotoxin levels in cow's milk samples derived from farms and shops. *Innate Immun.* 2015, 21, 531–536.
193. Smith GW. Supportive therapy of the toxic cow. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2005 Nov;21(3):595-614
194. Smith, K.L., Hogan, J.S. 1995. Epidemiology of mamitis. *Proceedings of The 3rd International Mamitis Seminar, Tel Aviv, Israel*, 3-12.
195. Smith, K.L., Todhunter, D.A., Schoenberger, P.S. 1985. Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention. *J. Dairy Sci.* 68, 1531-1553.
196. Sordillo, L.M., Shafer-Weaver, K., De Rosa, D. 1997. Immunobiology of the mammary gland. *J. Dairy Sci.* 80, 1851-1865.
197. Stevens, D. L., Yan, S. & Bryant, A. E. (1993). Penicillinbinding protein expression at different growth stages determines penicillin efficacy in vitro and in vivo: an explanation for the inoculum effect. *Journal of Infectious Diseases* 167, 1401–5.
198. Stromberg, L.R.; Mendez, H.M.; Mukundan, H. Detection Methods for Lipopolysaccharides: Past and Present. In: *Escherichia Coli- Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications*, 1st ed.; Samie, A., Ed.; Intech: London, UK, 2017.
199. Suriyasathaporn, W., Heuer, C., Noordhuizen-Stassen, E.N., Schukken, Y.H. 2000a. Hyperketonemia and the impairment of udder defense: a review. *Vet. Res.* 31, 397-412.
200. Suriyasathaporn, W., Schukken, Y.H., Nielen, M., Brand, A. 2000b. Low somatic cell count: a risk factor for subsequent clinical mastitis in a dairy herd. *J. Dairy Sci.* 83, 1248-1255.
201. Suzuki, K.; Shimamori, T.; Tsuchiya, M.; Niehaus, A.; Lakritz, J. Evaluation of a portable test system for assessing endotoxin activity in raw milk. *J. Vet. Med. Sci.* 2016, 78, 49–53.
202. Svensson, A.; Hahn-Hägerdal, B. Comparison of a gelation and a chromogenic Limulus (LAL) assay for the detection of gram-negative bacteria, and the application of the latter assay to milk. *J. Dairy Res.* 1987, 54, 267–273.
203. Syaifudin, A. M., Mukhopadhyay, S. C., Yu, R. L., Haji-Sheikh, M. J., & Chuang, C. H. (2011). Impedance spectroscopy of novel interdigital sensors for endotoxin detection. *Lecture Notes on Impedance Spectroscopy: Measurement, Modeling and Applications*, Volume 2, 103.
204. Tennant B, Harrold D, Reina-Guerra M. Hematology of the neonatal calf II. Responses associated with acute enteric infections, gram-negative septicemia, and experimental endotoxemia. *Cornell Vet* 1975; 65:457–75.
205. Theel, E.S. y Doern, C.D. "β-d-Glucan Testing Is Important for Diagnosis of Invasive Fungal Infections", *J Clin Microbiol.* Noviembre de 2013; 51(11): 3478-3483.
206. Thorne PS, Perry SS, Saito R, O'Shaughnessy PT, Mehaffy J, Metwali N, Keefe T, Donham KJ, Reynolds SJ. Evaluation of the Limulus amebocyte lysate and

- recombinant factor C assays for assessment of airborne endotoxin. *Appl Environ Microbiol.* 2010 Aug;76(15):4988-95
207. Tineke H. Jones, Kathleen M. Vail, Lynn M. McMullen, 2013 Filament formation by foodborne bacteria under sublethal stress, *International Journal of Food Microbiology*, 165 (2): 97-110.
208. Todhunter, D.A., Smith, K.L., Hogan, J.S., 1991a. *Serratia* species isolated from intramammary infections. *J. Dairy Sci.* 74, 1860-1865.
209. Todhunter, D.A., Smith, K.L., Hogan, J.S., Schoenberger P.S. 1991b. Gram-negative bacterial infections of the mammary gland in cows. *Am. J. Vet. Res.* 52, 184-188.
210. Tooke CL, Hinchliffe P, Bragginton EC, Colenso CK, Hirvonen VHA, Takebayashi Y, Spencer J. β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *J Mol Biol.* 2019 Aug 23;431(18):3472-3500. doi: 10.1016/j.jmb.2019.04.002. Epub 2019 Apr 5. PMID: 30959050; PMCID: PMC6723624.
211. Trautmann M, Einermann M, Zick R, Moriche A, Seidelmann M, Berger D. Antibacterial activity of meropenem against *Pseudomona aeruginosa* including antibiotic induced morphological changes and endotoxing-liberating effects. *Eur J Microbiol Infect Dis* 1998; 17: 754-760.
212. Van Damme, D.M., 1982. Mastitis caused by contaminated teat dip and dipping cup. *Vet. Med. Sm. Anim. Clin.* 77, 541-544.
213. Van Merit ASJPAM. Fever, anorexia and forestomach hypomotility in ruminants. *Vet Res Commun* 1987;11:407-22.
214. Vardanyan R.S., Hruba V.J., 32 - Antibiotics, Editor(s): R.S. Vardanyan, V.J. Hruba, *Synthesis of Essential Drugs*, Elsevier, 2006, Pages 425-498, ISBN 9780444521668,
215. Vecht, U., Meijers, K.C. Wisselink, H.J. 1987. *Klebsiella pneumoniae* mastitis als bedrijfsprobleem. *Tijdschr Diergeneeskd.* 112, 653-659.
216. Vipond, C., Findlay, L., Feavers, I., & Care, R. (2016). Limitations of the rabbit pyrogen test for assessing meningococcal OMV based vaccines. *ALTEX-Alternatives to animal experimentation*, 33(1), 47-53.
217. Vlaminck K, van Meirhaeghe H, van den Hende C, y col. Influence of endotoxin on abomasal emptying rate in cattle. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 1985;92: 392-5.
218. Waage, S.; Jonsson, P.; Franklin, A. Evaluation of a cow-side test for detection of gram-negative bacteria in milk from cows with mastitis. *Acta Vet. Scand.* 1994, 35, 207-212.
219. Wallace RJ, Gropp J, Dierick N, Costa LG, Martelli G, Brantom PG, Bampidis V, Renshaw DW, Leng L. Risks associated with endotoxins in feed additives produced by fermentation. *Environ Health.* 2016 Jan 15; 15:5. doi: 10.1186/s12940-016-0087-2. PMID: 26768246; PMCID: PMC4714429.
220. Ward, W.R., Hughes, J.W., Faull, W.B., Cripps, P.J., Sutherland, J.P., Sutherst, J.E., 2002. Observational study of temperature, moisture, pH and bacteria in straw bedding, and faecal consistency, cleanliness and mastitis in cows in four dairy herds. *Vet. Rec.* 151, 199-206.
221. Warner AE, DeCamp MM, Molina RM, y col. Pulmonary removal of circulating endotoxin results in acute lung injury in sheep. *Lab Invest* 1988;59: 219-30.
222. Watts, J. L. 1988. Etiological agents of bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 16, 41-66.

223. Wenz, J.R., Barrington G.M., Garry, F.B., Ellis, R.P., Magnuson, R.J. 2006. *Escherichia coli* Isolates' Serotypes, Genotypes, and Virulence Genes and Clinical Coliform Mastitis Severity. *J. Dairy Sci.* 89, 3408-3412.
224. Wenz, J.R., Barrington, G.M., Dinsmore, R.P. 1999. Differentiation of bacteremic and nonbacteremic cows with acute coliform mastitis. *J. Vet. Intern. Med.* 13, 279-284.
225. Wenz, J.R., Barrington, G.M., Garry, F.B., McSweeney, K.D., Dinsmore, R.P., Goodell, G. Callan, R.J. 2001. Bacteremia associated with naturally occurring acute coliform mastitis in dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 219, 976-981.
226. Williams K.L, Endotoxins: pyrogens, LAL testing and depyrogenation. 2007: CRC Press
227. Wilson, D.J.1, Gonzalez, R.N., Das, H.H. 1997. Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: prevalence and effects on somatic cell count and milk production. *J. Dairy Sci.* 80, 2592-2598.
228. Wray R, Iscla I, Gao Y, Li H, Wang J, et al. (2016) Dihydrostreptomycin Directly Binds to, Modulates, and Passes through the MscL Channel Pore. *PLOS Biology* 14(6): e1002473.
229. Wu H, Wang Y, Li H, Meng L, Zheng N, Wang J. Effect of Food Endotoxin on Infant Health. *Toxins (Basel)*. 2021 Apr 22;13(5):298. doi: 10.3390/toxins13050298. PMID: 33922125; PMCID: PMC8143472.
230. Wu, H.; Wang, Y.; Hao, X.; Meng, L.; Li, H.; Cheng, M.; Zheng, N.; Wang, J. Effect of TBC of raw milk and thermal treatment intensity on endotoxin contents of milk products. *Food Res. Int.* 2022, 152, 110816.
231. Wu, H.; Wang, Y.; Li, H.; Meng, L.; Zheng, N.; Wang, J. Effect of food endotoxin on infant health. *Toxins* 2021, 13, 298.
232. Wunderlich, C., Schumacher, S., & Kietzmann, M. (2015). Prostaglandin E2 as a read out for endotoxin detection in a bovine whole blood assay. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 38(2), 196-198.
233. Wyckoff, T.J.O.; Reatz, C.R.H.; Jackman, J.E. Antibacterial and antiinflammatory agents that target endotoxin. *Trends Microbiol.* 1998, 6, 154–159.
234. Wyckoff, T.J.O.; Van Berkel, T.J.C.; Kuiper, J. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin. Microbiol. Rev.* 2003, 16, 379–414.
235. Yeo TY, Choi JS, Lee BK, Kim BS, Yoon HI, Lee HY, Cho YW. Electrochemical endotoxin sensors based on TLR4/MD-2 complexes immobilized on gold electrodes. *Biosens Bioelectron.* 2011 Oct 15;28(1):139-45.
236. Zadoks, R.1, Fitzpatrick, J. 2009. Changing trends in mastitis. *Ir. Vet. J.* 1; 62 Suppl. 4, S59-S70.
237. Zadoks, R.N., Gillespie, B.E., Barkema, H.W., Sampimon, O.C., Oliver, S.P., Schukken, Y.H. 2003. Clinical, epidemiological y molecular characteristics of *Streptococcus uberis* infections in dairy herds. *Epidemiol. Infect.* 130, 335-349.
238. Zadoks, R.N., Griffiths, H.M., Munoz, M.A., Ahlstrom, C., Bennett, G.J., Thomas, E. Schukken, Y.H. 2011. Sources of *Klebsiella* y *Raoultella* species on dairy farms: be careful where you walk. *J. Dairy Sci.* 94, 1045-1051.
239. Zähringer U. Lindner B. Rietschel E.Th. (1994) Molecular structure of lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharides. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 50, 211–276.

240. Zhang L, Zhu C, Chen C, Zhu S, Zhou J, Wang M, Shang P, Determination of kanamycin using a molecularly imprinted SPR sensor, *Food Chemistry*, Volume 266,2018,Pages 170-174,ISSN 0308-8146
241. Ziv, G. Treatment of peracute and acute mastitis. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* 1992, 8, 1–15.

9- PUBLICACIONES

La Tesis Doctoral con título “*EVALUACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS INDUCIDA POR ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS EN EL TRATAMIENTO DE MAMITIS EN GANADO BOVINO*” ha sido parcialmente incluida en dos publicaciones. A continuación, se detalla el nombre de los autores, referencia completa y resumen de las dos publicaciones que incluyen resultados de la presente Tesis Doctoral.

TITULO: Validation of a Kinetic Turbidimetric Assay Based on Limulus Amebocyte Lysate (LAL) for Assessing Endotoxin Activity in Cow Milk

AUTORES: Pablo Flórez, María de Castro, David Rodríguez, José Manuel Gonzalo-Orden, Ana Carvajal

REFERENCIA: *Animals* (Basel), Jan 27., 13 (3): 427

DOI: 10.3390/ani13030427

Abstract: Mastitis, one of the most common diseases in dairy cattle, causes severe losses in the dairy sector worldwide and affects animal welfare. The disease is characterized by an inflammatory reaction of the mammary gland and is mainly caused by bacterial infections, including both Gram-negative and Gram-positive bacteria. The release of endotoxins associated to bacterial lysis is a weighty factor in the clinical course of Gram-negative associated mastitis and should be taken into consideration when using antibiotics in the treatment of these infections. Therefore, endotoxin detection in milk samples would be of help in the management of bovine mastitis. With this aim, we have validated a kinetic turbidimetric assay based on Limulus amebocyte lysate (LAL) for the quantification of endotoxins in milk samples. The assay was adapted to this particular matrix by incorporating filtration and dilution of the milk samples in the procedure. Our results demonstrate the robustness and usefulness of the assay, which allows the identification of coliform mastitis in milk samples from affected cows and the quantification of endotoxin activity in bulk and commercial milk samples. Further studies are required to evaluate the performance of the assay in mastitis milk samples associated to Gram-negative bacteria other than *Escherichia coli* as well as during the clinical course of these Gram-negative mastitis or after their treatment with antibiotics.

RESUMEN:La mastitis, una de las enfermedades más comunes en el ganado lechero, causa graves pérdidas en el sector lácteo en todo el mundo y afecta al bienestar animal. La enfermedad se caracteriza por una reacción inflamatoria de la glándula mamaria y está causada principalmente por infecciones bacterianas, tanto por bacterias Gram negativas y Gram positivas. La liberación de endotoxinas asociada a la lisis bacteriana es un factor de peso en el curso clínico de la mastitis asociada a gramnegativos y debe tenerse en cuenta a la hora de utilizar antibióticos en el tratamiento de estas infecciones. Por lo tanto, la detección de endotoxinas en muestras de leche sería de gran ayuda en la gestión de la mastitis bovina. Con este objetivo hemos validado un ensayo turbidimétrico cinético basado en lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) para la cuantificación de endotoxinas en muestras de leche. El ensayo se adaptó a esta matriz compleja incorporando la filtración y dilución de las muestras de leche en el procedimiento. Nuestros resultados demuestran la robustez y utilidad del ensayo, que permite la identificación de mastitis coliforme en muestras de leche de vacas afectadas y la cuantificación de endotoxinas en muestras de leche de tanque de la explotación y leches envasadas comerciales.

TITULO: Evaluación de la liberación de endotoxinas bacterianas inducida por antibióticos utilizados en el tratamiento de mastitis por bacterias Gram negativas en el ganado bovino

AUTORES: Pablo Flórez, María de Castro, Antonio R. Zarza, José Manuel Gonzalo-Orden, Marta E. Alonso, Ana Carvajal

REFERENCIA: Boletín Anembe, 143

LOCALIZADOR: URL <https://bit.ly/3MgvhNI>

RESUMEN: La mastitis es una de las enfermedades más comunes en el ganado lechero y causa de importantes pérdidas económicas en el sector lácteo en todo el mundo, así como de efectos negativos sobre el bienestar animal. Se caracteriza por una reacción inflamatoria de la glándula mamaria que produce cambios significativos en la composición bioquímica de la leche, estando asociada principalmente a infecciones por bacterias, tanto Gram negativas como positivas. La liberación de endotoxinas asociada a la lisis bacteriana es un factor relevante en el curso clínico de la mastitis causada por Gram negativas y debe tenerse en consideración al usar antibióticos en el tratamiento de estas infecciones. Por ello, el estudio de la cinética de inhibición de diferentes bacterias patógenas y de la cinética de liberación de endotoxinas tras su exposición a diferentes antibióticos proporciona información de interés para el manejo clínico de esta importante enfermedad. Con este objetivo hemos validado un ensayo turbidimétrico cinético basado en lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) para la cuantificación de endotoxinas en muestras de leche y en este trabajo presentamos los resultados obtenidos tras simular una infección intramamaria con dos especies Gram negativas, *E. coli* y *Enterobacter aerogenes*, y su exposición a cuatro antibióticos, bencilpenicilina (BP), dihidroestreptomicina (ST), cefalosporina (CF) y cefapirina (CSY), determinando las cinéticas de inhibición de crecimiento y de liberación de endotoxinas en comparación con controles sin tratamiento antibiótico.