



**Determinación del perfil lipídico y microbiológico de la leche proveniente de vacas con mastitis en el área de influencia de la universidad de las Fuerzas Armadas  
ESPE**

Salazar Canchala, Melanie Maylen

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Dugarte Jiménez, Nahir Yerely. PhD.

13 de marzo del 2024

# Reporte de verificación de contenido



Terminado Salazar\_Melanie\_Trabajo ...

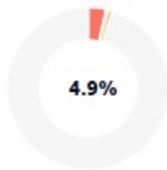
## Scan details

Scan time:  
February 29th, 2024 at 13:13 UTC

Total Pages:  
78

Total Words:  
19427

## Plagiarism Detection



Types of plagiarism		Words
Identical	3%	588
Minor Changes	0.2%	47
Paraphrased	1%	189
Omitted Words	13.8%	2677

## AI Content Detection



Text coverage  
● AI text  
● Human text

Firma:

---

Dugarte Jiménez, Nahir Yerely. PhD.

Directora



**Departamento de Ciencias de la Vida**  
**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

### **Certificación**

Certifico que el trabajo de integración curricular: **“Determinación del perfil lipídico y microbiológico de la leche proveniente de vacas con mastitis en el área de influencia de la universidad de las Fuerzas Armadas ESPE”** fue realizado por la señorita **Salazar Canchala, Melanie Maylen**, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizada en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

**Santo Domingo de los Tsáchilas, 13 de marzo de 2024**

Firma:

---

**Dugarte Jiménez, Nahir Yerely. PhD.**

C.C: 1753479193



# ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Departamento de Ciencias de la Vida

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

### Responsabilidad de Autoría

Yo, **Salazar Canchala, Melanie Maylen**, con cédula de ciudadanía n° 2300254360, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **Determinación del perfil lipídico y microbiológico de la leche proveniente de vacas con mastitis en el área de influencia de la universidad de las Fuerzas Armadas ESPE**, es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 13 de marzo de 2024

Firma:

Salazar Canchala, Melanie Maylen

C.C: 2300254360



# ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA  
Departamento de Ciencias de la Vida

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

### Autorización de Publicación

Yo **Salazar Canchala, Melanie Maylen**, con cédula de ciudadanía n°2300254360, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Determinación del perfil lipídico y microbiológico de la leche proveniente de vacas con mastitis en el área de influencia de la universidad de las Fuerzas Armadas ESPE**, en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 13 de marzo de 2024

Firma:

---

**Salazar Canchala, Melanie Maylen**

C.C: 2300254360

## **Dedicatoria**

Dedico este trabajo de titulación a mis padres, Rosa y Eduardo, por apoyarme de todas las maneras imaginables, durante toda la mi trayectoria académica. Agradezco infinitamente su apoyo y su confianza en mí.

## Agradecimientos

Agradezco de manera cariñosa y especial a mis padres. Gracias por la motivación, el apoyo, el cariño y la confianza que colocaron sobre mí desde que tengo memoria. Este título también lo lucen ustedes. Les amo.

Agradezco a mis hermanas y hermano, por su compañía y apoyo incondicional en estos años de mi formación profesional, es grato contar con ustedes.

A Pablo Valdez, por ser una pareja increíble y un apoyo incondicional. Te adoro.

A mi tutora, Nahir Dugarte, por guiarme en cada parte del estudio realizado y haber sido un soporte fundamental.

A mi profesor, Armando Reyna Bello, por su apoyo y amistad. Por los conocimientos brindados durante la carrera, por la motivación y pasión que trasmite al hablar de ciencia e investigación.

A mi profesora Sandra Naranjo, quien aportó conocimientos en el ámbito microbiológico para la presente investigación.

A Fausto Bedoya, Katty Medina, César Yambay y Francisco Suasnavas por su ayuda durante mi estancia en los laboratorios de biología molecular, microbiología y ciencias químicas.

A mis amigas/os: Alejandra, Emily, Alisson, Diego, Wendy, Malle, Emilio, Christopher, Néstor, Daniela y Lesly. Estoy orgullosa de lo que son y hacen, qué grato haber coincidido con ustedes.

## Índice

<i>Dedicatoria</i> .....	<i>I</i>
<i>Agradecimientos</i> .....	<i>II</i>
<i>Resumen</i> .....	<i>1</i>
<i>Abstract:</i> .....	<i>2</i>
<b>1. <i>Introducción y estado del arte:</i></b> .....	<b>3</b>
Introducción: .....	3
Estado del arte:.....	4
Objetivos: .....	6
General:.....	6
Específicos: .....	6
<b>2. <i>Marco Conceptual</i></b> .....	<b>6</b>
Anatomía y fisiología de la glándula mamaria bovina.....	6
Parénquima .....	7
Estroma .....	8
Producción de leche en ganado vacuno.....	9
Mastitis en vacas productoras de leche .....	10
Perfil lipídico en la leche .....	10
Técnica de determinación del perfil lipídico en la leche.....	11
Técnica de determinación del perfil microbiológico en la leche .....	12
<b>3. <i>Metodología/Técnicas/Diseño</i></b> .....	<b>14</b>
Metodología y técnicas .....	18
Elaboración del plan de muestreo.....	18
Determinación de mastitis en el ganado de interés .....	18
Análisis 'rápido' de la leche proveniente de vacas con y sin mastitis .....	19

	Análisis cromatográfico para determinar perfil lipídico en leche proveniente de vacas con mastitis.....	20
	Análisis microbiológico de agentes causales de mastitis empleando leche proveniente de vacas con la infección .....	24
4.	<i>Resultados</i> .....	31
	Resultados .....	31
	Determinación de mastitis en el ganado lechero .....	31
	Análisis ‘rápido’ de parámetros de la leche proveniente de vacas con y sin mastitis .....	32
	Análisis microbiológico de agentes causales de mastitis empleando leche proveniente de vacas con la infección .....	33
	Perfil lipídico de leche proveniente de vacas con y sin mastitis.....	44
	Análisis estadístico .....	51
5.	<i>Conclusiones y recomendaciones</i> .....	55
6.	<i>Referencias bibliográficas</i> .....	57

### **Índice de tablas**

	<i>Tabla 1. Composición de la leche (g/100g) proveniente de diferentes mamíferos. ....</i>	10
	<i>Tabla 2. Composición de la leche. ....</i>	11
	<i>Tabla 3. Materiales, insumos, reactivos y equipos empleados durante la presente investigación. ....</i>	14
	<i>Tabla 4. Cómo realizar la lectura de la reacción del test.....</i>	19
	<i>Tabla 5. Concentración de las diluciones para la curva de calibración.....</i>	23
	<i>Tabla 6. Lectura de la reacción de la prueba CMT para determinación de mastitis.....</i>	31

<i>Tabla 7. Lectura de los parámetros de la leche positiva y negativa para mastitis.....</i>	<i>32</i>
<i>Tabla 8. Recuento de UFC en placas sembradas. ....</i>	<i>34</i>
<i>Tabla 9. Resultados de la identificación morfológica macroscópica de las colonias bacterianas de las muestras de leche proveniente de vacas con mastitis. ....</i>	<i>35</i>
<i>Tabla 10. Resultados de la tinción Gram y las pruebas bioquímicas realizadas en los aislados. ....</i>	<i>42</i>
<i>Tabla 11. Agentes bacterianos que provocan mastitis hallados en las diferentes muestras de leche. ....</i>	<i>43</i>
<i>Tabla 12. Porcentaje de grasa en las muestras de leche positiva y negativa para mastitis .....</i>	<i>44</i>
<i>Tabla 13. Ácidos grasos existentes en las muestras de leche positiva y negativa para mastitis.....</i>	<i>47</i>
<i>Tabla 14. Agrupaciones de muestras con MSC (+, ++ y +++) de acuerdo con los ácidos grasos que comparten entre ellas.....</i>	<i>50</i>
<i>Tabla 15. Porcentaje de ácido graso en la grasa de leche proveniente de vacas sin mastitis.....</i>	<i>51</i>
<i>Tabla 16. Porcentaje de ácido graso en la grasa de leche proveniente de vacas con mastitis (+) .....</i>	<i>52</i>
<i>Tabla 17. Porcentaje de ácido graso en la grasa de leche proveniente de vacas con mastitis (++) y (+++). ....</i>	<i>54</i>

## Índice de figuras

<i>Figura 1. Anatomía de la glándula mamaria bovina. ....</i>	<i>7</i>
<i>Figura 2. Etapas de la producción de leche durante ciclo de lactancia en vacas.....</i>	<i>9</i>
<i>Figura 3. Pasos para la tinción gram y diferencia entre coloración de bacterias gram+ y gram-. ....</i>	<i>13</i>
<i>Figura 4. Cromatograma de la mezcla FAME, donde se hallan 37 ácidos grasos. ....</i>	<i>24</i>
<i>Figura 5. Criterios para la descripción morfológica de colonias bacterianas. ....</i>	<i>27</i>
<i>Figura 6. Algunos aislados bacterianos teñidos de acuerdo con la prueba de Gram. ...</i>	<i>38</i>
<i>Figura 7. Resultados ante la prueba de catalasa en aislados bacterianos. ....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 8. Resultados ante la prueba de indol en aislados bacterianos.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 9. Resultados de la prueba de fermentación de manitol empleando MSA para identificar Staphylococcus.....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 10. Resultados de la prueba de fermentación de lactosa utilizando EMB para diferenciar E. coli en el aislado F<sub>3</sub>. ....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 11. Cromatogramas de muestras sin la inflamación (-) y con los diferentes grados de mastitis (+, ++ y +++). ....</i>	<i>46</i>
<i>Figura 12. Ácidos grasos compartidos entre las unidades experimentales agrupadas .</i>	<i>50</i>
<i>Figura 13. Diagrama de barras para comparar el perfil lipídico total entre vacas sanas y enfermas.....</i>	<i>55</i>
<i>Figura 14. Diagrama de barras que muestra los ácidos grasos totales por unidad experimental analizada.....</i>	<i>65</i>

## Resumen

La mastitis es la inflamación de la ubre causada por bacterias patógenas. La leche es una fuente de ácidos grasos para los humanos y es necesario asegurarse que carece de microorganismos nocivos. Por ello, el objetivo de este estudio fue determinar el perfil lipídico y microbiológico de leche proveniente de animales con mastitis. Para el análisis del perfil lipídico se usó GC-FID, se recolectó leche de vacas con y sin la afección, se esterificó la grasa de las muestras y se compararon los ácidos grasos existentes. Durante el estudio microbiológico, se recolectaron muestras de leche procedente de vacas con mastitis, se aislaron colonias y se identificaron mediante pruebas bioquímicas. En conclusión, se establecieron como agentes de la enfermedad a *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *E. coli* y *Bacillus spp.*, y se determinó que la mastitis provocó un cambio significativo en el perfil lipídico, decreciendo su cantidad y concentración.

**Palabras clave:** Mastitis bovina, cromatografía de gases, perfil lipídico

**Abstract:**

Mastitis is an udder inflammation caused by pathogenic bacteria. Milk is a source of fatty acids for humans, and it is necessary to ensure that it is free of harmful microorganisms. Therefore, the aim of this study was to determine the lipid and microbiological profile of milk from animals with mastitis. GC-FID was used for the lipid profile analysis, where milk was collected from cows with and without the condition, the fat in the samples was esterified, and the existing fatty acids were compared. During the microbiological study, milk samples were collected from cows with mastitis, colonies were isolated, and identified using biochemical tests. In conclusion, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *E. coli*, and *Bacillus spp.* were established as disease agents, and it was determined that mastitis caused a significant change in the lipid profile, decreasing its quantity and concentration.

**Keywords:** *Bovine mastitis, gas chromatography, lipid profile*

## 1. Introducción y estado del arte:

### Introducción:

La leche cumple un papel indispensable en la dieta desde el nacimiento de un ser vivo, pues su composición nutricional asegura que es una fuente de vitaminas, proteínas, ácidos grasos y minerales, que fortalecerán el sistema inmunológico de quien la consuma. De tal forma, es un alimento que aporta una variedad de micronutrientes esenciales, como calcio, fósforo, potasio, magnesio, que se absorben fácilmente en el intestino delgado (Górska, Rejman, Laskowski, & Czczotko, 2019).

En consecuencia, es el primer alimento consumido por los mamíferos, entre ellos los humanos, debido a que su ingesta beneficia al sistema metabólico y cardiovascular, siendo así un factor determinante para el crecimiento y desarrollo biológico (Pereira & Vicente, 2017). De tal modo, es necesario evaluar la calidad e integridad de la leche consumida por el ser humano, que proviene, en su mayoría, de vacas.

En cuanto a la mastitis bovina, es una afección que incide en la composición lipídica e integridad microbiológica de la leche. En esencia, surge por diversos géneros bacterianos, como *Staphylococcus* y *Streptococcus*, e, incluso, por levaduras (Leitner, Krifucks, Merin, Lavi, & Silanikove, 2006), (Park, et al., 2007). Como tal, la mastitis se clasifica en clínica y subclínica dependiendo de los signos que presente el bovino, siendo necesario un diagnóstico correcto para, posteriormente, otorgar un tratamiento adecuado.

Durante la mastitis clínica (MC) se presenta inflamación en las ubres, llegando a producir leche coagulada, provocando pérdidas en el sector ganadero; en cuanto a la mastitis subclínica (MSC), no genera cambios evidentes en el ganado vacuno, por lo que la afección se mantiene inadvertida (Haxhiaj, Wishart, & Ametaj, 2022). Al existir contenido bacteriano, las propiedades de la leche, así como su valor nutricional, son alteradas, de forma que existe la posibilidad que la leche contenga patógenos, elevando el riesgo de enfermedades zoonóticas (Schadt, 2023).

Con respecto al perfil lipídico de la leche, podría verse influenciado por la presencia de mastitis, ya que los microorganismos que la generan interfieren directamente en su valor nutricional y características organolépticas, existiendo un cambio anormal en la leche. Es de gran importancia resaltar que, sobre todo, en casos de MSC la leche posee un elevado contenido de bacterias patógenas (Schadt, 2023)., por lo que el estudio del contenido de lípidos y microorganismos de leche proveniente de vacas con MSC, es fundamental.

Como último punto a destacar, la cromatografía de gases (GC) es una técnica de separación que consta de dos fases, una denominada estacionaria, y otra que se mueve en una dirección definida, lo que le otorga el nombre de fase móvil (Stauffer, Dolan, & Newman, 2008). Usualmente, la cromatografía de gases con detección de ionización de llama (GC-FID) proporciona una alta eficiencia durante la separación de compuestos orgánicos, como lípidos, siendo útil para identificar con precisión mezclas complejas, basándose en la polaridad y puntos de ebullición específicos de los componentes de interés (Stauffer, Dolan, & Newman, 2008)., (Feng, Sun, Song, Zhuang, & Yao, 2019).

### **Estado del arte:**

Con base en los datos publicados por el (Instituto Nacional de Estadística y Censos, 2021) acerca de la producción de leche en Ecuador en 2020, se registró un promedio de 6.152.841 litros de leche a nivel nacional, demostrando que el sector agropecuario brinda un gran aporte al Producto Interno Bruto (PIB) y otorga 1.5 millones de empleos en el sector agrícola orientado a la actividad de producción láctea (Ramírez, 2016). Por consiguiente, mantener estabilidad dentro de dicho sector es crucial para la economía de gran parte de la población ecuatoriana.

En el territorio nacional, según datos recolectados por la Fundación Heifer Ecuador, los ecuatorianos tienen un consumo per cápita de, al menos, 105 litros al año (Baquerizo & Córdova, 2022)., donde el 57% es leche que no posee registro sanitario, ni es sometida a controles de calidad antes de su distribución a la sociedad, contribuyendo al riesgo de adquirir enfermedades relacionadas al consumo de leche no salubre (Terán, 2019)

Para ello, se necesita aplicar buenas prácticas agrícolas, incluyendo medidas apropiadas de control sanitario sobre el ganado, como la regulación de enfermedades que garanticen la seguridad de los consumidores y de toda la cadena productiva (Cortéz, Duarte, & De Melo, 2021). Aplicar aquello asegura la obtención idónea de materia prima láctea para el respectivo proceso de industrialización, libre de contenido biológico indeseado, con contenido nutricional adecuado y, a su vez, que cumpla con la normativa vigente de calidad fisicoquímica y microbiológica del país (normativa INEN 9).

Como se indicó previamente, en el caso de mastitis clínica se presentan síntomas que evidencian la infección en la glándula mamaria, de modo que facilita la detección temprana y control de la enfermedad, así como un óptimo tratamiento al ganado, mitigando así la pérdida de productos lácteos (Martins, et al., 2019). No obstante, el inconveniente surge durante la mastitis subclínica, pues no se presenta signos clínicos.

A pesar de la falta de sintomatología, la calidad nutricional de la leche sigue siendo afectada por los organismos que generaron la infección en la glándula mamaria (Schadt, 2023). Por su parte, la grasa de la leche se compone de ácidos grasos, quienes constituyen una fuente de energía para los humanos y logran incidir en el valor nutricional de dicho lácteo (Colette & Monnier, 2011).

La GC-FID es una técnica que permite indagar los lípidos, como los ácidos grasos, en diferentes muestras de interés (Mohan, et al., 2019). En el caso del estudio del perfil lipídico de la leche, la GC-FID brinda información relevante para conocer la calidad nutricional y, por consiguiente, su contribución a la dieta humana (Romanzin, Corazzin, Piasentier, & Bovolenta, 2013)., (Idda, et al., 2016).

Bajo este contexto, es necesario determinar el perfil lipídico y microbiológico de la leche, ya que la mastitis incide directamente en la composición láctea y bacteriana, siendo relevante conocer cómo el perfil lipídico depende del estado de salud de la vaca (con mastitis o sin mastitis).

**Objetivos:****General:**

Determinar el perfil lipídico y microbiológico de la leche proveniente de vacas con mastitis en el área de influencia de la universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

**Específicos:**

Realizar el plan de muestreo para identificación de casos de mastitis en el ganado bovino de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

Identificar microbiológicamente los agentes causales de mastitis.

Determinar el perfil lipídico de la leche mediante cromatografía de gases.

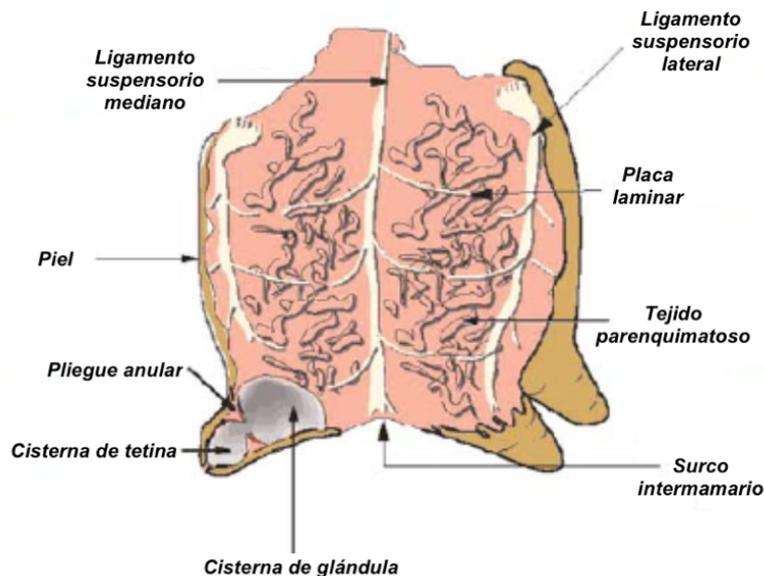
**2. Marco Conceptual****Anatomía y fisiología de la glándula mamaria bovina**

La anatomía y fisiología de la glándula difiere entre los mamíferos, dependiendo de la especie en cuestión (Delgadillo, 2016). Como tal, la glándula mamaria es un órgano exocrino capaz de secretar leche durante la etapa de lactancia, liberando dicho líquido mediante los pezones de la especie específica (Nichols, 2021). En el caso de los rebaños lecheros, se emplea la leche producida para venta y elaboración de otros productos lácteos.

La ubre de la vaca se divide en “cuartos” y se sitúa en posición inguinal, es decir, cerca de la ingle del animal (Anand, et al., 2022). Este órgano se integra por: ligamento suspensorio mediano y lateral, placa laminar, pliegue anular, tejido parenquimatoso, cisterna de tetina, surco intermamario y cisterna de glándula (véase **figura 1**). En adición, es relevante reconocer que los cuartos de la ubre son independientes entre sí, por lo que cada uno posee su propio tejido parenquimatoso (Nickerson & Akers, 2011).

## Figura 1

*Anatomía de la glándula mamaria bovina.*



*Nota.* Se rotula la estructura general de la glándula mamaria, así como el aparato suspensorio. Tomado y adaptado de Mamary Gland (en Encyclopedia of Dairy Sciences) de Nickerson y Akers (2011).

Como se visualiza en la **figura 1**, los ligamentos suspensorios mediano y lateral mantienen unida la ubre al cuerpo del rumiante, donde el tejido estromal juega un papel importante para sostener las glándulas mamarias. En adición, el parénquima y el estroma, también llamado tejido de soporte, son las dos estructuras que componen a la ubre (Sanz, 2021). La primera de estas se responsabiliza de producir leche y se forma por conductos secretores de este líquido y por alvéolos; mientras que el estroma da el soporte necesario para mantener unido al parénquima, incluyendo así al tejido conectivo, adiposo y la piel (Oliver & Sordillo, 1988).

### **Parénquima**

Los alvéolos y los conductos componen al parénquima (Nickerson & Akers, 2011). Por su parte, los alvéolos son estructuras esféricas rodeadas de tejido conectivo y

encargados de secretar leche, por lo que se consideran la unidad funcional de la glándula mamaria (Anand, et al., 2022). En sí, las células epiteliales alveolares agrupadas (lobulillos) son capaces de sintetizar las proteínas, grasas, azúcares y demás componentes en la leche, mediante hormonas, como la oxitocina (National Academy of Sciences., 1988).

La oxitocina brinda un estímulo en el tejido mamario, provocando que las células mioepiteliales, que se sitúan alrededor de los alvéolos, se compriman, forzando a que la leche sea transportada desde los alvéolos hacia los pezones para ser liberada, hecho que facilita la alimentación de los terneros o el ordeño (Gorewit, Wachs, Sagi, & Merrill, 1986)., de modo que esta hormona es indispensable para una producción lechera apropiada.

Las agrupaciones de los lobulillos forman lóbulos, unas estructuras de mayor tamaño que se rodean de tejido conectivo perteneciente al estroma. Cada cuarto de la ubre es considerado un lóbulo individual (National Academy of Sciences., 1988)., por lo que se asegura que existe un sistema de conductos lácteos independientes entre sí en todos los cuartos, existiendo autonomía y mayor control en la extracción de leche apta para consumo, ya que se logra detectar las patologías de manera individual, brindar un tratamiento oportuno sin detener la producción en los cuartos sanos (Nickerson & Akers, 2011).

### ***Estroma***

El compartimento estromal se halla compuesto por varias células, como células sanguíneas y mesenquimales, adipocitos, leucocitos y fibroblastos, y por una matriz extracelular, cuyos componentes son algunas glicoproteínas y proteoglicanos, como laminina, colágeno, entre otros (Anand, et al., 2022)., y cada uno de ellos es necesario para la estabilidad del órgano glandular (ubre).

El tejido estromal es integrado, principalmente, por células adiposas, quienes almacenan lípidos, constituyendo así la grasa mamaria y reteniendo la red de conductos que se hallan en el parénquima. El resto de componentes del tejido conectivo del estroma proporciona, además de una estructura física estable, nutrientes, sangre y células inmunes

(macrófagos y mastocitos) para una defensa inmunológica apropiada del seno lactífero (Biswas, Banerjee, Baker, Kuo, & Chowdhury, 2022).

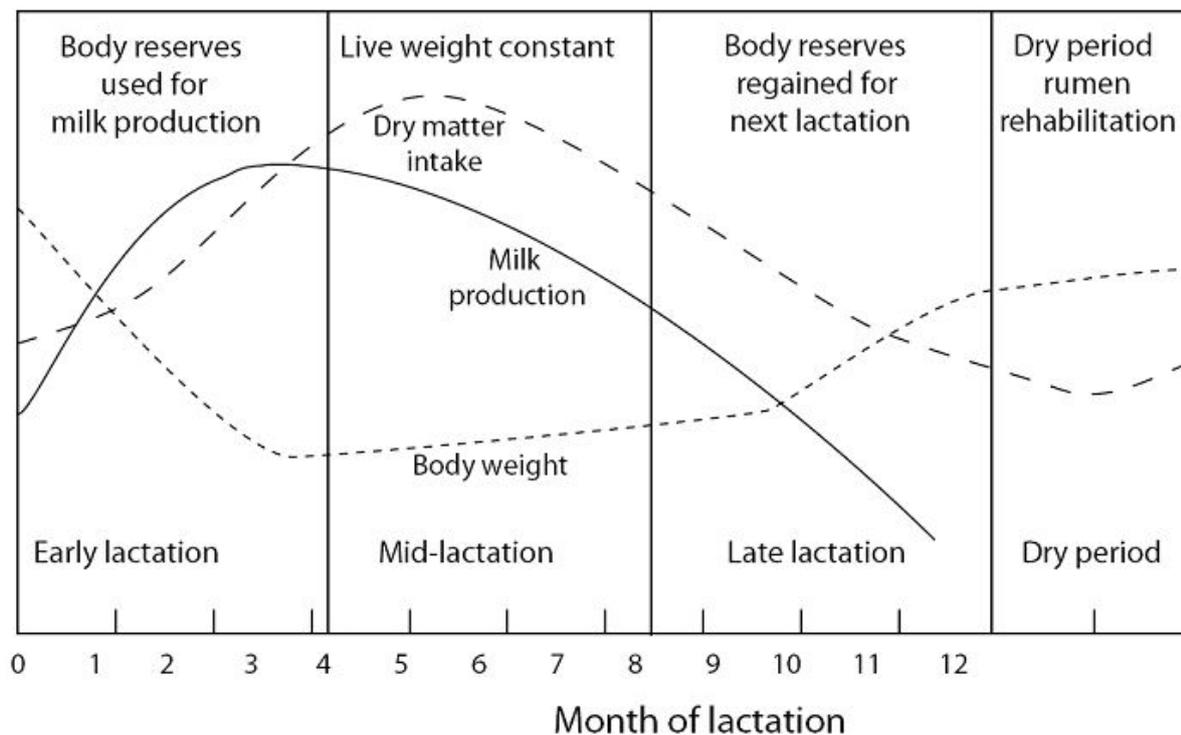
Existe evidencia que asegura que el tejido estromal de soporte que rodea a la parte de la ubre que origina los alvéolos y conductos que secretan leche, son requeridos para un desarrollo normal del tejido mamario (Akers, 2017). Por consiguiente, se comprueba que el tejido conectivo del estroma, como se indicó previamente, sostiene los lóbulos y lobulillos provenientes del parénquima (Nickerson & Akers, 2011).

### Producción de leche en ganado vacuno

Para producir leche, las vacas deben atravesar el proceso de parto, dando inicio así al ciclo de lactancia, el cual es el período existente entre un parto y el próximo. Dicho ciclo se compone por cuatro etapas: lactancia temprana, media, tardía y un período denominado como 'seco'. Las tres primeras fases duran alrededor de 3-4 meses, mientras que la última es de, aproximadamente 65 días (véase **figura 2**) (Moran, 2015).

#### Figura 2

*Etapas de la producción de leche durante ciclo de lactancia en vacas.*



*Nota.* Tomado y adaptado de *Managing Cow Lactation Cycles* de Moran (2015).

### ***Mastitis en vacas productoras de leche***

La mastitis es una afección de índole inflamatoria del tejido mamario que surge por traumatismos en la ubre y, la mayoría de veces, a raíz de una infección por microorganismos (Cheng & Han, 2020). Esta patología afecta sustancialmente a los hatos lecheros, provocando disminución en la producción de leche, lo que conlleva pérdidas económicas (Morales, et al., 2023).

La mastitis logra dañar el tejido que recubre la glándula mamaria, lo que reduce el número de células epiteliales, así como su actividad, afectando así la producción y calidad de leche, específicamente el perfil lipídico y microbiológico. Cuando la infección es grave y crónica, el tejido secretor se convierte en tejido fibroso, malogrando la ubre; provocando que tenga una cantidad menor de tejido adiposo, epitelio alveolar y áreas luminarias, e incrementando el tejido conectivo interalveolar (Sharma & Jeong, 2013).

En definitiva, es imprescindible controlar la mastitis bovina, lo cual se logra a través de técnicas de antisepsia para la inhibición y prevención de crecimiento de microorganismos en los pezones, así como la limpieza adecuada del equipo automático de ordeño, manejo del estrés ambiental, vacunación contra patógenos, entre otros (Cheng & Han, 2020).

### **Perfil lipídico en la leche**

Los componentes de la leche varían dependiendo de la especie en cuestión (véase **tabla 1**) (Tetra Pak, 2012)., por lo que el análisis del perfil lipídico logra informar cómo cambian esos parámetros de acuerdo con el mamífero en cuestión.

**Tabla 1**

*Composición de la leche (g/100g) proveniente de diferentes mamíferos.*

Especie	Parámetros para comparar				
	Agua	Grasa	Caseína	Lactosa	Proteína de suero
Vaca	87.3	4.4	2.8	4.6	0.6
Búfalo	82.2	7.8	3.2	4.9	0.6
Oveja	82.0	7.6	3.9	4.8	0.7

Especie	Parámetros para comparar				
	Agua	Grasa	Caseína	Lactosa	Proteína de suero
Cabra	86.7	4.5	2.6	4.4	0.6
Humano	87.1	4.6	0.4	6.8	0.7

*Nota.* Tomado y adaptado de Chapter 1 Primary Production of milk (En Dairy Processing Handbook) de Tetra Pak (2012).

Asimismo, estos componentes pueden diferir considerablemente entre vacas de diferentes especies (véase **tabla 2**) (Bylund, 1995).

**Tabla 2**

*Composición de la leche (%).*

Componentes	Límites de variación	Media
Agua	85.2 – 89.5	87.5
Sólidos totales	10.5 – 14.5	13.0
Grasa	2.5 – 6.0	3.9
Proteínas	2.9 – 5.0	3.4
Lactosa	3.6 – 5.5	4.8
Minerales	0.6 – 0.9	0.8

*Nota.* Tomado y adaptado de Dairy processing handbook de Bylund, 1995.

Es posible que la leche proveniente de ganado vacuno con mastitis posea un cambio significativo en el perfil lipídico, por lo que el análisis de los lípidos es importante para conocer el valor nutricional y la calidad de leche, sobre todo cuando proviene de ganado con antecedentes médicos e historial patológico.

#### ***Técnica de determinación del perfil lipídico en la leche***

Algunas de las técnicas más empleadas son la espectroscopia infrarroja (IR), resonancia magnética nuclear (RMN) y la cromatografía de gases.

### **Cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID).**

La técnica analítica de cromatografía con gases es empleada para la separación y posterior análisis de los componentes orgánicos volátiles en una muestra biológica, como la leche. Esta técnica, emplea un gas a modo de fase móvil, y las fases estacionarias pueden ser sólidas o líquidas (Forgács & Cserhádi, 2003).

Con respecto a los equipos que integran el cromatógrafo de gases, está el sistema del gas carrier (arrastre), usualmente helio o nitrógeno debido a su baja adsorción, el inyector, la columna, el detector y la unidad de procesamiento de datos. Específicamente, el inyector ingresa la muestra a analizar al inicio de la columna del GC, pudiéndose dividir en dos grupos: de vaporización y en columna; donde los primeros emplean altas temperaturas que vaporizan las muestras líquidas, requiriendo de jeringas que introduzcan la muestra al inyector; mientras que los segundos colocan la muestra directamente en la columna sin necesidad de vaporizarla (Forgács & Cserhádi, 2003).

Por su parte, el detector de ionización de llama (FID) se utiliza en GC debido a su amplio rango dinámico y su alta sensibilidad a moléculas orgánicas. En consecuencia, el FID es útil para la detección y cuantificación de ácidos grasos en leche, ya que detecta la cantidad de carbonos existentes en una muestra (Forgács & Cserhádi, 2003).

En el FID, el gas carrier, que lleva la muestra, es mezclado con el gas de combustión (hidrógeno), para luego generar iones. Luego, un voltaje negativo de polarización y un electrodo son aplicados para atraer y contabilizar dichos iones generados; básicamente el FID emplea dicha combustión para detectar los compuestos orgánicos (Forgács & Cserhádi, 2003).

### ***Técnica de determinación del perfil microbiológico en la leche***

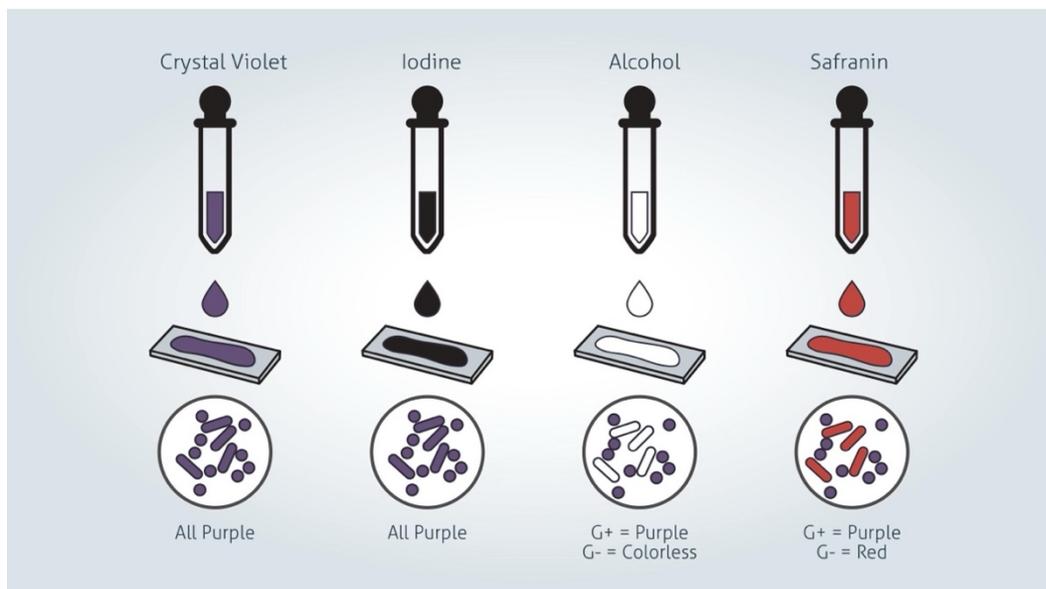
Del mismo modo, para la identificación microbiológica se aplican diversas técnicas, como tinción Gram, pruebas bioquímicas, medios de cultivo selectivos o diferenciales y se describe macroscópicamente la morfología de las colonias bacterianas.

### Tinción Gram.

La tinción gram es una técnica de tinción diferencial que permite clasificar a las bacterias como gram-positivas (gram +) y gram-negativas (gram -), dependiendo de la pared celular de peptidoglicano de los microorganismos en cuestión (Erkmen, 2021). En el caso de las gram+, la capa de este polímero es gruesa, lo que provoca que los colorantes empleados para la tinción sean retenidos en mayor concentración, mientras que en las gram- ocurre lo contrario, la capa de peptidoglicano es delgada, obteniendo una coloración más leve (véase **figura 3**) (Erkmen, 2021).

### Figura 3

*Pasos para la tinción gram y diferencia entre coloración de bacterias gram+ y gram-.*



*Nota.* Tomado y adaptado de Gram positive vs Gram negative stain de Steward (2023).

### Pruebas bioquímicas.

Este tipo de ensayos identifican y diferencian géneros bacterianos de acuerdo con las actividades bioquímicas que realicen los microorganismos, como su capacidad para metabolizar compuestos o producir enzimas específicas. Se ejecutan pruebas de bioquímica microbiana debido al beneficio tiempo-costo y alta precisión que brindan durante la identificación microbiológica (Zhou & Li, 2015). Algunos test bioquímicos son las pruebas

de óxido-fermentación, indol, KIA (Kliger Iron Agar), catalasa, rojo de metilo, oxidasa, fermentación de carbohidratos o azúcares, entre otros.

### **Medios de cultivo.**

Los medios de cultivo son generales, enriquecidos selectivos o diferenciales, y se hallan en estado líquido o sólido, donde cada uno reúne los nutrientes necesarios para que un determinado grupo de microorganismos crezcan de manera apropiada. de forma que la elección del medio depende, estrictamente, del tipo de bacteria a cultivar (Sood, Singhal, Bhat, & Kumar, 2019).

Los medios de cultivos generales, como agar nutriente, permite que varios géneros microbianos crezcan, mientras que los medios selectivos, diferenciales y enriquecidos contienen componentes adicionales que favorecen o inhiben el crecimiento de ciertos microorganismos (Boundless, 2013).

### **Descripción macroscópica de la morfología.**

La morfología de las colonias posibilita la caracterización preliminar en el ámbito bacteriano. Para realizar una descripción de las características de un microorganismo, este debe cultivarse en un medio no selectivo, del cual será aislado para así obtener una colonia de una única especie microbiana que se identificará a nivel de género o especie por otras técnicas de identificación microbiológica (Fernández, García, Saéz, & Valdezate, 2010).

## **3. Metodología/Técnicas/Diseño**

La **tabla 3** muestra los materiales, incluidos insumos, reactivos y equipos, que fueron requeridos para el presente trabajo.

### **Tabla 3**

*Materiales, insumos, reactivos y equipos empleados durante la presente investigación.*

<b>Detalle</b>	<b>Característica</b>
<b>E</b> Autoclave	Marca Tuttnauer

<i>Detalle</i>	<i>Característica</i>
<b>E</b> Cromatógrafo de gases	Marca Chromatec, modelo Crystal-9000, SN: 2391411
<b>I</b> Medio agar nutriente	Marca TM Media
<b>I</b> Agua estéril	Agua destilada y autoclavada
<b>I</b> Helio	Gas
<b>E</b> Generador de hidrógeno de alta pureza	JSC SDO Chromatec-Crystal 9000, modelo 10.600HPM, SN: 2210845
<b>M</b> Cinta de papel	Estándar
<b>M</b> Cinta de autoclave	Cinta con tinta indicadora
<b>M</b> Papel craft	Papel de estraza
<b>M</b> Cajas petri	De vidrio
<b>E</b> Micropipeta	De 2-10 $\mu$ L
<b>I</b> Fatty acids methyl esters in n-heptane	Fatty acid methyl esters mix (FAME mix) BWRM®, BW5653
<b>I</b> Agua ultrapura	Agua tipo 1 para generador de hidrógeno
<b>I</b> Agua destilada	Destilación de agua estándar
<b>M</b> Cooler	Contenedor térmico de espuma flex
<b>I</b> Paquetes de hielo	Para almacenamiento en frío
<b>I</b> Guantes	De nitrilo
<b>M</b> Asa de Digralsky	De metal
<b>I</b> Puntas de micropipeta	De plástico
<b>M</b> Frasco de vidrio	Transparente con tapa rosca
<b>M</b> Frasco de vidrio	Tipo ámbar con tapa rosca
<b>M</b> Vial de plástico con tapón de rosca de 1.5 mL	Marca ALWSCI Vial
<b>M</b> Tubos de microcentrífuga	Eppendorf

	<b>Detalle</b>	<b>Característica</b>
<b>M</b>	Tubos de ensayo	De vidrio
<b>M</b>	Vaso de precipitado	De vidrio
<b>M</b>	Matraz aforado de 50 mL	De vidrio
<b>M</b>	Pipetas aforadas de 10 y 40 mL	De vidrio
<b>M</b>	Espátula para pesar	De metal
<b>I</b>	Helio ultrapuro (R)	INDURA® GrupoAIR products
<b>I</b>	Aire sintético extra puro	INDURA® GrupoAIR products
<b>I</b>	Jeringa de 10 uL para cromatógrafo	De vidrio con aguja de punta biselada
<b>I</b>	Columna capilar para GC	FAME 100M x 0.25 mm x 0.25 µm, SN: CJAY20230130
<b>E</b>	Refrigeradora de laboratorio de 2-8°C	Marca BIOBASE, modelo BPR-5V588
<b>E</b>	Incubadora	Marca Memmert
<b>E</b>	Balanza analítica	Marca Adam Equipment, modelo NBL -124i, SN: AE9X8245
<b>E</b>	Agitador Vortex Genie 2	Marca Scientific Industries
<b>E</b>	Cámara de flujo laminar	Marca BIOBASE
<b>E</b>	J-2 Colony Counter	Marco ISOLAB
<b>M</b>	Probeta	De vidrio
<b>E</b>	Microcentrífuga en frío (MIKRO 200 R)	Hettich Instruments, SN: 0003982-12
<b>E</b>	Centrífuga	Marca Hettich, modelo EBA200, SN: 0013904-03
<b>E</b>	Milk Analyzer	Marca BIOBASE, modelo BKMA-MK
<b>E</b>	Microscopio óptico	Marca Zeiss

	<b>Detalle</b>	<b>Característica</b>
<b>M</b>	Mechero de alcohol	Con alcohol al 96%
<b>I</b>	Toallas de papel	Papel absorbente de limpieza
<b>I</b>	Paleta para prueba de mastitis	De plástico, color negro
<b>R</b>	EcoWeek	Limpiador ácido concentrado
<b>R</b>	EcoDay	Limpiador alcalino concentrado
<b>R</b>	Sodio metálico	Sólido
<b>R</b>	Sulfato de sodio anhidro	Sólido
<b>R</b>	n-heptano al 99%	LOBA Chemie, CAS: 142-82-5.
<b>R</b>	Metanol	Fisher Chemical, CAS: 67-56-1
<b>R</b>	Ácido clorhídrico fumante al 37%	Supelco, 1.00317.2500
<b>R</b>	Reactivo california mastitis test (CMT)	Laboratorios LIFE
<b>R</b>	Alcohol cetona	Estándar
<b>R</b>	Safranina	Estándar
<b>R</b>	Cristal violeta	Estándar
<b>R</b>	Lugol	Estándar
<b>R</b>	Reactivo de Kovacs	Estándar
<b>R</b>	Agar nutriente	Marca TM Media
<b>R</b>	Agua de peptona	Marca TM Media
<b>R</b>	Agar manitol salado (MSA)	Marca TM Media
<b>R</b>	Agar eosina azul de metileno (EMB)	Marca TM Media

*Nota.* Se identifican a los materiales con la letra **M**, los equipos con la letra **E**, los insumos con la letra **I** y los reactivos con la letra **R**.

## **Metodología y técnicas**

### ***Elaboración del plan de muestreo***

Se escogió un método no probabilístico por conveniencia, debido a la limitación de los recursos económicos, tiempo y cantidad de población para muestrear. Se determinó la población de vacas en el área de influencia de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, estableciendo que existen 45 vacas. Para certificar que la muestra escogida sea representativa y que los resultados sean aplicables a una población de interés, se establecieron los criterios de inclusión y exclusión para la determinación del perfil lipídico y microbiológico.

En ambos análisis, el criterio de exclusión fue vacas no lactantes, ya que no son el grupo objetivo en la presente investigación, mientras que el criterio de inclusión fueron las vacas lactantes. Por ello, se seleccionaron todas las vacas lactantes disponibles en el área de influencia de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE para determinar la presencia o ausencia de mastitis subclínica mediante California Mastitis Test (CMT), obteniendo así 24 muestras que cumplen con los criterios.

El grupo de muestreo se dividió en dos clases: vacas con mastitis clínica (MC), quienes muestran signos de la enfermedad y vacas con mastitis subclínica (MSC), aquella población que es asintomática pero que poseen la infección.

Tras detectar mastitis subclínica en la población de interés, se aplicó muestreo selectivo: para el análisis del perfil lipídico, se seleccionó la población total de vacas lactantes, es decir 24 vacas; mientras que, para el análisis microbiológico, se seleccionaron las vacas lactantes con MSC, dando un total de 15 vacas muestreadas.

### ***Determinación de mastitis en el ganado de interés***

Se lavó la glándula mamaria con agua y se desechó la leche del primer ordeño. Se colocó 2 mL de leche proveniente de cada cuarto en cada pocillo de la paleta de plástico del kit de California mastitis test (CMT), posteriormente se adicionó la misma cantidad del

reactivo CMT, el cual contiene sodio lauril sulfato (2%) y cristal violeta (0.0033%), y se hizo la lectura de acuerdo con la **tabla 4**.

**Tabla 4**

*Cómo realizar la lectura de la reacción del test.*

<b>Lectura CMT</b>	<b>Criterios para considerar</b>
<b>Negativo</b>	El estado de la solución permanece inalterado. La mezcla sigue en estado líquido.
<b>Trazas</b>	Se torna un precipitado en el piso de la paleta que desaparece pronto.
<b>1(+)</b>	Hay mayor precipitado, pero no se forma gel.
<b>2(++)</b>	El precipitado se torna denso y se concentra en el centro.
<b>3(+++)</b>	Se torna un gel muy denso que se adhiere a la paleta.

*Nota.* Tomado y adaptado de Ficha técnica del CMT por Laboratorios Industriales Farmacéuticos Ecuatoriano (LIFE) (2022).

En caso de obtener un resultado positivo para mastitis, se procede a realizar el análisis cromatográfico y microbiológico de las muestras en cuestión.

### ***Análisis 'rápido' de la leche proveniente de vacas con y sin mastitis***

Se determinaron nueve parámetros de la leche: grasa, densidad, sólidos, proteínas, punto de congelación, temperatura, lactosa, agua y sales. Para ello, se empleó el 'Milk analyzer' de BIOBASE y se prepararon dos soluciones de limpieza.

#### **Preparación de soluciones de limpieza.**

#### ***Preparación de una solución al 10% de EcoWeek: Limpiador ácido concentrado.***

En un recipiente de plástico, previamente etiquetado, se preparó una solución al 10% (1:10): se adicionaron 450 mL de agua destilada y se agregaron 50 mL de la solución madre 'EcoWeek'. Se homogeneizó la solución elaborada.

***Preparación de una solución al 2% de EcoDay: Limpiador alcalino concentrado.***

Se etiquetó el recipiente de plástico a emplear y se preparó una solución al 2% (1:50), para lo que se adicionaron 490 mL de agua destilada y se agregaron 10 mL de la solución madre 'EcoDay'. Se homogeneizó la solución elaborada.

***Análisis rápido en 'Milk analyzer'.***

Antes de iniciar el análisis, se limpió y desinfectó el analizador de leche con la solución limpiadora ácida al 10% y, luego, con la solución limpiadora básica al 2%. Luego, se vertió 20 mL de la muestra (leche) en un recipiente de vidrio, que se colocó en el compartimento del analizador. Se cliqueó en iniciar el análisis para muestra de leche de vaca. El tiempo de medición de los parámetros mencionados fue de 60 segundos.

Cabe destacar que cada 5 muestras, se realizó nuevamente la limpieza y desinfección con la solución de EcoDay al 2%.

***Análisis cromatográfico para determinar perfil lipídico en leche proveniente de vacas con mastitis***

Para el estudio de los lípidos existentes en leche de vacas con mastitis, se separó la grasa de la leche, para luego transformar dichos lípidos en su forma de ésteres metílicos, con el fin de volatilizar los lípidos y analizarlos apropiadamente mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID).

***Recolección de muestras.***

En envases de plástico, se recolectó leche de los cuartos infectados con mastitis, y se etiquetaron correctamente para evitar confundir las muestras. Hasta su posterior análisis, se mantuvieron las muestras en un cooler con paquetes de hielo para almacenamiento en frío.

***Separación de la grasa en leche.***

Se acondicionó la centrífuga refrigerada a 4°C, y se insertaron en tubos de microcentrífuga (tubos eppendorf), con una micropipeta, 1.5 mL de leche fresca proveniente

de vacas con mastitis. Se centrifugó la muestra a velocidad máxima (15000 rpm) durante 20 minutos para separar la grasa del suero lácteo mediante inversión, desechando este último. Las muestras se refrigeraron a 4°C hasta su próximo uso.

Cabe destacar que, en una balanza analítica, se pesaron los recipientes: antes y después de adicionar las muestras determinadas; y luego de centrifugar y desechar el suero lácteo.

### ***Determinación de porcentaje de grasa en la leche.***

Se aplicó la **fórmula 1** empleada por Moneeb et al. (2021) para indicar el porcentaje de grasa, donde el peso final del recipiente hace referencia al peso tras eliminar el suero lácteo del tubo eppendorf.

#### **Fórmula 1**

*Porcentaje de grasa.*

$$\%grasa = \frac{(masa\ de\ recipiente + masa\ de\ la\ muestra) - masa\ de\ recipiente}{masa\ de\ la\ muestra} \times 100$$

*Nota.* Tomado y adaptado de Effect of fat extraction methods on the fatty acids composition of bovine milk using gas chromatography de Moneeb et al. (2021).

### **Preparación de soluciones para esterificación de ácidos grasos.**

#### ***Preparación del reactivo de transesterificación.***

Se preparó diariamente para el análisis 5 mL de la solución. La preparación se realizó en la campana extractora de gases: se vertieron, aproximadamente, 4 mL de metanol en el matraz de aforo, se adicionaron 0,23 g de sodio metálico y se esperó que cesen las burbujas formadas por la reacción; luego se aforó a 5 mL. La solución de metóxido de sodio (CH<sub>3</sub>NaO) que se formó fue almacenada en un frasco ámbar.

#### ***Preparación de solución de ácido clorhídrico y metanol (HCl:CH<sub>3</sub>OH).***

Se preparó una solución en relación 1:4 de ácido clorhídrico y metanol. En pipetas aforadas, se midieron 10 mL y 40 mL de ácido clorhídrico (HCl) concentrado al 37% y metanol, respectivamente. La preparación se realizó en la campana extractora de gases: en

un frasco ámbar, se vertió el metanol y después el ácido, para evitar salpicaduras y disipar el calor producido.

### **Esterificación de grasa láctea.**

El proceso de esterificación se basó en la normativa ISO 15884:2002, en la que se brinda un procedimiento para formar ésteres metílicos de ácidos grasos provenientes de grasa láctea.

En un tubo de centrífuga, se pesaron 0.1 g de la grasa láctea previamente separada y se adicionaron 5 mL de heptano, el tubo se agitó en vortex hasta disolver la muestra. Con una micropipeta, se añadieron 200  $\mu$ L de metóxido de sodio al tubo y se agitó en vortex durante 5 minutos; cambiando de punta, se agregaron 100  $\mu$ L de la solución HCl:CH<sub>3</sub>OH (1:4) y se agitó por 60 segundos. Se agregó 0,5 g de sulfato de sodio anhidro y se llevó a vortex por 1 minuto.

Se centrifugaron los tubos por 5 minutos a 3000 rpm a temperatura ambiente. Culminado este tiempo, se colocó una alícuota del sobrenadante translúcido en un vial con tapón de rosca de 1,5 mL y se desechó el restante. Se almacenó en congelador a -10°C hasta su próximo análisis cromatográfico.

### **Análisis cromatográfico.**

Se empleó helio como gas carrier, mientras que el hidrógeno y el aire puro fueron gases auxiliares (de combustión) para el detector FID. Cada corrida (run) de muestra tardó 74.13 minutos y la inyección fue de 5  $\mu$ L.

En los parámetros de entrada del inyector, se configuró a 240°C, se colocó en modo 'split' con flujo de split de 1,4 mL/min por 2 minutos y caudal de purga del tabique (septum purge flow) de 3,0 mL/min. En cuanto a la columna, se optó por velocidad constante a 21,000 cm/s a 60 minutos, con una presión de 252,302 kPa y flujo capilar de 1,346 mL/min. Con respecto al horno, se fijó 60°C como temperatura inicial durante 1 minuto, luego se subió a 145 °C en una rampa de 8°C/min por 15 minutos, se colocó una rampa final de 2°C/min hasta llegar a 220 °C en 10 minutos y la temperatura de postcorrida se ajustó a

240°C. En el FID, se estableció la temperatura a 250°C, donde el flujo de los caudales de helio, hidrógeno y aire fueron 25 mL/min, 25 mL/min y 250 mL/min, respectivamente.

Tras esterificar los lípidos de la grasa proveniente de leche con mastitis, se inyectaron con la jeringa del cromatógrafo 5 µL de la muestra deseada y se cliqueó el botón de inicio, visualizando los picos obtenidos al culminar los 74,13 minutos de corrida.

Se analizó cada pico, estableciendo a qué ácido graso perteneció y la concentración en la que se hallaba en la muestra corrida mediante la curva de calibración realizada.

#### ***Curva de calibración para análisis cromatográfico.***

Se realizaron diluciones del estándar de ésteres metílicos de ácidos grasos en heptano. Para realizar las diluciones se aplicó la **fórmula 2**.

#### **Fórmula 2**

*Fórmula empleada para las diluciones*

$$C_1V_1=C_2V_2$$

Las concentraciones (µg/mL) empleadas fueron 200, 150, 100 y 0. Para ejecutar cada dilución se empleó heptano a modo de diluyente y se partió del estándar mencionado previamente, cuya concentración es 200 µg/mL. Esto se visualiza en la **tabla 5**.

#### **Tabla 5**

*Concentración de las diluciones para la curva de calibración.*

<b>Nomenclatura</b>	<b>Volumen de estándar (mL)</b>	<b>Volumen de diluyente (mL)</b>	<b>Concentración de la dilución (µg/mL)</b>
Standard 200	0,5	0	200
Standard 150	0,375	0,125	150
Standard 100	0,250	0,250	100
Standard 0	0	0.5	0

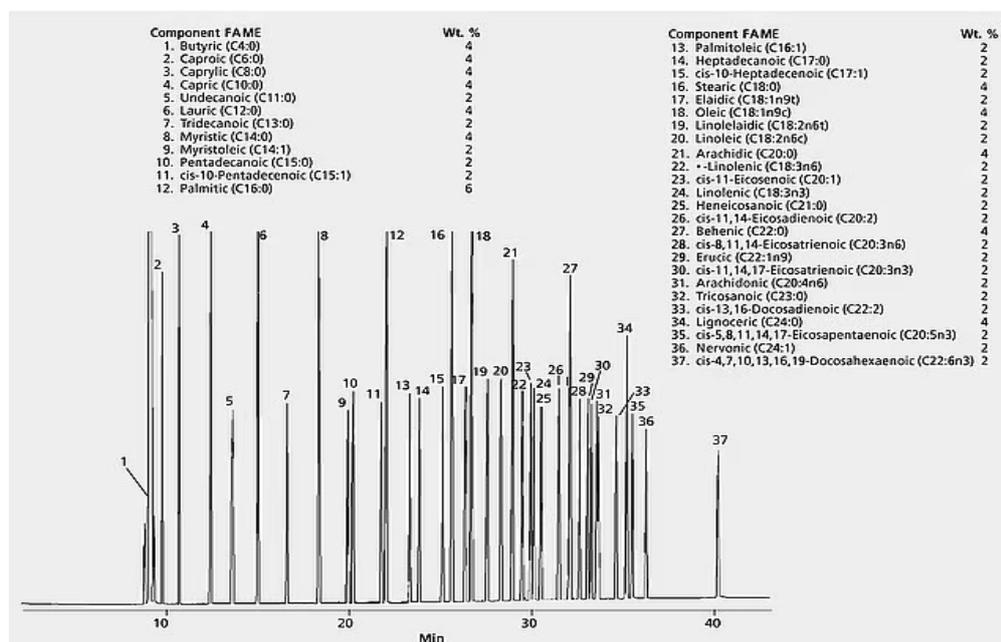
*Nota.* Como diluyente se empleó heptano y el volumen final de todas las diluciones fue 0.5 mL. Se realizaron los cálculos respectivos con la fórmula 2 y se prepararon las

diluciones asumiendo que los volúmenes son aditivos, debido a que la cantidad estándar de ésteres metílicos de ácidos grasos no era suficiente para diluir en serie.

Se corrió cada dilución del estándar bajo las condiciones especificadas, luego se identificó cada pico correspondiente a los ácidos grasos de acuerdo con los tiempos de retención, basándose en un cromatograma de Sigma-Aldrich donde presentan el análisis GC de una mezcla FAME (fatty acid methyl esters) (véase **figura 4**).

#### Figura 4

*Cromatograma de la mezcla FAME, donde se hallan 37 ácidos grasos.*



*Nota.* Por Sigma-Aldrich Co. LLC (2023).

### ***Análisis microbiológico de agentes causales de mastitis empleando leche proveniente de vacas con la infección***

Para mantener la esterilidad y evitar la contaminación cruzada, se desinfectó el área de trabajo durante cada análisis, empleando sablón y alcohol al 70%; mientras que la cámara de flujo laminar, además de desinfectarse con las sustancias mencionadas, se esterilizó con luz UV durante 20 minutos y se mantuvo encendido el flujo laminar durante 10 minutos antes de su uso para eliminar contaminantes y partículas no deseadas.

Considerando que las bacterias podrían ser patógenas y zoonóticas, se destaca que se aplicaron normas de bioseguridad estrictas, evitando la exposición y contacto directo de las bacterias a cualquier ser vivo, resguardando así la salud de cada individuo existente.

En adición, los recipientes de recolección de muestras y las cajas Petri fueron esterilizadas antes de su empleo a 121°C durante 20 minutos, al igual que el medio de cultivo.

### **Recolección de muestras.**

La recolección de muestras se rigió al protocolo establecido por Bewley et al. (2010): los pezones se lavaron con agua para retirar suciedad, luego se desinfectó con solución de yodo al 0,5%; se secó cada pezón con una toalla individual. Posteriormente, se limpió el extremo de cada pezón con alcohol al 70% y, evitando que el envase estéril hiciese contacto con cualquier superficie, se recolectaron 2 mL de leche y se etiquetaron los recipientes.

Hasta su posterior análisis, se mantuvieron las muestras en un cooler con paquetes de hielo para almacenamiento en frío. Es importante considerar que la siembra bacteriana se realizó el mismo día de la recolección de muestras, o 48 horas post-recolección manteniendo las muestras congeladas.

### **Inoculación de placas Petri empleando las muestras de leche.**

Para preparar las 34 placas en las que se inocularon las muestras de leche; se pesaron 16.8 g de agar nutriente, se colocó el medio en un frasco de vidrio que contenía 600 mL de agua destilada y un agitador magnético. Esta solución se disolvió empleando una plancha de calentamiento con agitación. Luego, se cerró levemente el frasco de vidrio con su respectiva tapa rosca y se autoclavó bajo las condiciones estándar (121° por 20 min.).

Dentro de la cámara de flujo laminar, se dispensó el medio autoclavado en cajas Petri estériles y, para verificar la correcta preparación del medio de cultivo, se colocó

overnight a 37°C en la incubadora; en caso de que haya existido contaminación, se esterilizaba y se desechaba; caso contrario se refrigeraba a 4°C hasta su posterior uso.

Se encendió un mechero de alcohol dentro de la cámara de flujo laminar previamente esterilizada, se colocaron tres vasos de precipitado: el primero con alcohol al 96% para flamear el asa de Digrafsky; el segundo con agua destilada estéril para limpiar el asa; y el último para desechar las puntas de micropipeta utilizadas. En cada siembra, se esterilizó el asa insertándola en alcohol al 96% y sometiéndola al fuego durante 10-15 segundos, asegurándose que cuando se inoculaba la placa, el asa se había enfriado.

Para la inoculación, se flameó la caja Petri con el medio en el mechero y se colocaron 3 µL de leche recolectada en frascos estériles en el centro, seguidamente se extendió la muestra con el asa de Digrafsky esterilizada, realizando un movimiento uniforme alrededor de la caja. Se repitió el proceso hasta sembrar las muestras recolectadas.

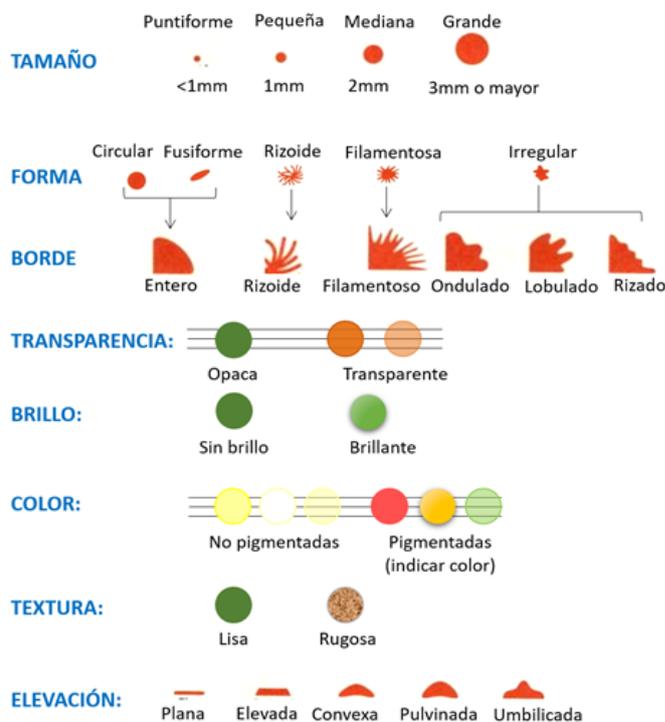
Las placas inoculadas se colocaron a 37°C por 24 horas y se visualizó el crecimiento de cada muestra.

#### **Aislamiento de bacterias.**

Para el aislamiento se empleó agar nutriente como medio de crecimiento. Anticipadamente, se describió la morfología de las colonias bacterianas que crecieron en el medio agar nutriente según los criterios de (Guillen, 2020). (véase **figura 5**). De acuerdo con la descripción morfológica, se seleccionaron las diferentes colonias bacterianas existentes en cada muestra para el aislamiento.

**Figura 5**

*Criterios para la descripción morfológica de colonias bacterianas.*



*Nota.* Por Guillen (2020).

Para el aislamiento, se empleó la técnica de siembra en cuadrantes, en la que se divide a las cajas Petri en cuatro partes, de forma que se optimizaron los materiales e insumos empleados. Asimismo, se rotuló cada placa y cuadrante de acuerdo con la muestra sembrada y a la bacteria seleccionada.

El procedimiento se realizó, en su totalidad, dentro de la cámara de flujo laminar. Con el asa de siembra, se tomó el microorganismo previamente seleccionado y se sembró por estriado en uno de los cuadrantes. Se esterilizó el asa de inoculación sometiéndola al fuego del mechero de alcohol hasta que su color llegó al rojo vivo. Se realizaron los mismos pasos con todas bacterias.

### **Tinción Gram.**

El procedimiento de fijación de las bacterias en el portaobjetos se realizó dentro de la cámara de flujo laminar, mientras que la tinción se llevó a cabo fuera de dicho lugar.

### ***Fijación de las bacterias en el portaobjetos.***

Se colocó una gota de agua en el portaobjetos a emplear. Se utilizó un mechero de alcohol para flamear el asa bacteriológica, de forma que se evitó la contaminación cruzada. Con este material, se flameó el asa bacteriológica hasta el rojo vivo y, cuando esta se enfrió, se tocó levemente una de las colonias aisladas para después llevar la muestra hacia la gota de agua y, dando tres toques en ella, se suspendió el microorganismo seleccionado.

Se flameó nuevamente el asa de inoculación para evitar una sobrecarga bacteriana y, considerando una dimensión de 3 x 2 cm en el portaobjetos, se realizó el frotis y se esperó unos minutos a que el agua del frotis se secase. Posteriormente, se pasó de manera rápida el portaobjetos sobre la llama del mechero de alcohol. Esta acción se repitió tres veces, lo cual aseguró que la colonia quedó fijada en el portaobjetos. Se repitió esta acción con todas las colonias aisladas.

### ***Coloración de Gram.***

Para teñir las bacterias, no fue obligatorio mantener condiciones de asepsia. Se colocaron 2 gotas de cristal violetas sobre el frotis y se esperaron 60 segundos. Luego, se colocaron 2 gotas de lugol por 1 minuto. Se colocaron 2 gotas de alcohol-cetona para decolorar las células teñidas y se dejó actuar por 10 segundos. Finalmente, se realizó la contratinción aplicando 2 gotas de safranina sobre el área de frotis durante 1 minuto. Después de colocar cada reactivo, se realizaron lavados con agua destilada. Se dejó secar al aire libre las placas teñidas para su posterior observación.

### ***Observación.***

Se empleó un microscopio óptico marca Zeiss. El portaobjetos teñido se enfocó con los lentes 10X y 40X hasta obtener una resolución apropiada. Luego, se colocó una gota de aceite de inmersión y se cambió al aumento de 100x para visualizar de manera correcta la morfología bacteriana.

**Pruebas bioquímicas.**

Las pruebas bioquímicas se realizaron dentro de la cámara de flujo para evitar que las placas con las colonias aisladas se contaminen. Cada prueba bioquímica se rigió a los procedimientos descritos por (MacFaddin, 2000).

***Prueba de la catalasa.***

Se colocó 1 gota de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) al 3% sobre el portaobjetos a utilizar. Se flameó el asa bacteriológica en el mechero hasta que adquirió un color rojo intenso, asegurando así esterilidad en el material. Cuando se enfrió, hizo contacto con una de las colonias aisladas, la cual se colocó sobre el reactivo mencionado. Se esperaron 10 segundos hasta observar burbujeo.

***Prueba de indol.***

Se preparó agua de peptona para 95 tubos eppendorf; se pesaron 2,1 g del medio y se disolvieron en 140 mL de agua destilada sobre una plancha de calentamiento y se autoclavó a condiciones estándar.

Dentro de la cámara de flujo, se colocaron 1,3 mL del medio preparado dentro de cada tubo previamente rotulado. Luego, con un asa de siembra previamente esterilizada, se tomó una colonia aislada y se inoculó el tubo eppendorf. Se esterilizó nuevamente el asa bacteriológica. Se repitió el procedimiento con todos los aislados bacterianos y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

Al día siguiente, se cercioró que hubiese crecimiento de la colonia en los tubos inoculados y que el tubo control se mantuviese sin crecimiento.

Para continuar con la prueba de indol, se colocaron 3 gotas del reactivo de Kovacs en los tubos y se esperaron unos segundos para observar la reacción.

***Prueba de fermentación de manitol.***

Se preparó medio de cultivo manitol salado (MSA), se autoclavó bajo condiciones estándar y se dispensó en cajas Petri esterilizadas. Para verificar la correcta preparación y

esterilización del medio, se incubó a 37°C por 24 horas y se comprobó que no crecieran microorganismos.

Al igual que en el aislamiento, se aplicó la técnica de cuadrantes, en la que a cada cuadrante se le designó una colonia bacteriana que se sospecha pertenece al género *Staphylococcus* debido a sus reacciones bioquímicas y morfología microscópica.

Para la inoculación, se esterilizó al rojo vivo el asa de siembra, se enfrió la misma, se tomó la colonia y se realizó el estriado de la colonia seleccionada. Se esterilizó nuevamente el asa de inoculación para evitar contaminación cruzada. Las placas inoculadas se incubaron a 37°C por 24 horas, para luego visualizar el crecimiento en cada caja Petri.

#### ***Prueba de fermentación de lactosa.***

Se preparó medio de cultivo diferencial eosina azul de metileno (EMB), se autoclavó bajo condiciones estándar y se dispensó en cajas Petri esterilizadas. Se llevó a la incubadora a 37°C durante un día y se verificó que no había crecimiento de bacterias, de forma que se comprobó la correcta preparación del medio y su esterilidad.

Se aplicó la técnica de cuadrantes, donde a cada cuadrante le correspondía una colonia bacteriana aislada que, posiblemente, pertenecía al género *Enterobacteriaceae* o es *Escherichia coli*.

Para inocular el medio, se tomó una de las colonias sospechosas con un asa esterilizada y se realizó el estriado en la placa asignada. Se esterilizó nuevamente el asa de inoculación para evitar contaminación cruzada. Se incubaron las placas durante un día a 37°C, para después observar los crecimientos en las cajas Petri.

## 4. Resultados

### Resultados

#### *Determinación de mastitis en el ganado lechero*

La **tabla 6** señala los casos positivos para mastitis, por lo que en dichas muestras se realizó el análisis microbiológico para identificar, posteriormente, a qué género pertenecen las bacterias presentes en la muestra.

**Tabla 6**

*Lectura de la reacción de la prueba CMT para determinación de mastitis.*

<b>Muestra</b>	<b>Lectura CMT</b>
157	-
175	-
152	-
148	-
173	-
96	-
178	-
191	-
125	-
172	+
168	+
200	+
192	+
150	+
149	+
144	+
199	+

Muestra	Lectura CMT
147	+
185	+
163	++
133	++
181	++
103	++
187	+++

*Nota.* La lectura se realizó con base a la tabla 4. Cada número en la columna de muestras hace referencia a las vacas empleadas para esta investigación.

### ***Análisis 'rápido' de parámetros de la leche proveniente de vacas con y sin mastitis***

En la **tabla 7** se detallan los resultados obtenidos al medir las leche positivas y negativas para mastitis en el Milk Analyzer.

**Tabla 7**

*Lectura de los parámetros de la leche positiva y negativa para mastitis.*

Muestra	Grasa	Densidad	Lactosa	Sólidos	Proteínas	H <sub>2</sub> O	T°	FP	Sales
<b>157 (-)</b>	04,02	29,58	04,79	08,75	03,18	00,00	30,3	-0,560	00,71
<b>175 (-)</b>	02,56	30,29	04,72	08,59	03,14	00,00	30,2	-0,541	00,70
<b>152 (-)</b>	06,42	24,30	04,31	07,92	02,83	00,96	29,6	-0,515	00,65
<b>148 (-)</b>	04,51	26,80	04,45	08,13	02,94	00,19	30,8	-0,519	00,67
<b>173 (-)</b>	02,39	29,19	04,54	08,26	03,02	00,57	30,8	-0,517	00,67
<b>96 (-)</b>	03,74	28,83	04,65	08,48	03,00	00,00	31,1	-0,540	00,69
<b>178 (-)</b>	03,90	26,14	04,27	07,81	02,83	00,00	30,5	-0,494	00,64
<b>191 (-)</b>	06,16	26,11	04,55	08,33	02,99	00,00	31,3	-0,543	00,69
<b>125 (-)</b>	04,67	25,54	04,28	07,83	02,83	03,84	30,1	-0,500	00,64

Muestra	Grasa	Densidad	Lactosa	Sólidos	Proteínas	H <sub>2</sub> O	T°	FP	Sales
172 (+)	04,31	30,28	04,93	09,00	03,27	00,00	32,4	-0,580	00,74
168 (+)	01,69	34,86	05,28	09,59	03,53	00,00	31,1	-0,606	00,78
200 (+)	04,73	26,65	04,45	08,14	02,94	00,00	31,3	-0,521	00,67
192 (+)	04,14	27,64	05,45	07,38	02,43	05,00	30,4	-0,527	00,73
150 (+)	05,14	28,86	04,82	08,82	03,19	00,00	30,9	-0,572	00,72
149 (+)	04,91	25,27	04,27	07,82	02,82	03,84	31,1	-0,500	00,64
144 (+)	03,15	26,90	04,30	07,83	02,85	05,38	31,1	-0,492	00,64
199 (+)	01,04	33,94	05,06	09,20	03,39	00,00	31,0	-0,574	00,74
147 (+)	03,36	27,03	04,34	07,92	02,88	04,03	31,3	-0,499	00,65
185 (+)	03,41	29,73	04,74	08,64	03,15	00,00	30,0	-0,549	00,78
163 (++)	01,55	29,85	04,53	08,24	03,03	01,73	31,2	-0,511	00,67
133 (++)	02,47	27,33	04,27	07,79	02,85	06,73	30,2	-0,485	00,63
181 (++)	02,32	23,02	03,63	06,61	02,41	21,92	31,5	-0,406	00,54
103 (++)	03,79	26,43	04,30	07,86	02,85	04,42	32,0	-0,497	00,64
187 (+++)	01,85	22,95	02,92	09,10	03,25	23,10	31,6	-0,490	00,74

*Nota.* Se identifica a la temperatura como T° y al punto de congelación con las letras FP

(Frozen point). Las '+' y '-' junto a los números referenciales a las vacas. La grasa, sólidos, proteínas, lactosa, contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y las sales se hallan en %, mientras que la densidad se expresa en kg/m<sup>3</sup>, y la temperatura y punto de congelación en C°.

***Análisis microbiológico de agentes causales de mastitis empleando leche proveniente de vacas con la infección***

**Recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) en las muestras.**

Se hizo el recuento de las colonias que crecieron en las placas inoculadas mediante el J-2 Colony Counter (véase **tabla 8**). Posiblemente la diferencia entre los resultados obtenidos para cada unidad experimental (vaca muestreada) surgió a raíz de la respuesta inmune. Por ello, al hallarse en una etapa inicial de mastitis, la muestra 172 (+) presentó

mayor cantidad de UFC que la muestra grado 3 (187+++), en la cual el organismo de la vaca podría haber desarrollado un mecanismo de defensa para controlar la infección, existiendo un menor recuento de colonias

La discrepancia en las UFC se atribuyó a varias causas, una explicación es que las muestras con menor número de recuento de colonias podrían hallarse en un estadio de respuesta inmune en la que el animal comenzó a reducir la carga microbiológica con el propósito de controlar la bacteria que alteró su estado de salud, mediante la liberación de citocinas, como el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) y la interleucina 1 (IL-1) (Daruna, 2012).

Es importante destacar que los linfocitos T colaboradores (helper) son glóbulos blancos cruciales durante la activación del sistema inmune adquirido. El TNF- $\alpha$  es activado por la respuesta inmunitaria Th1, un tipo de linfocito T-helper, a fin de inducir una mayor y mejor respuesta por parte de los macrófagos, facilitando la respuesta inflamatoria. Por otra parte, la IL-1, induce la respuesta inmunitaria mediada por Th2, la cual propicia la síntesis de IgA, una inmunoglobulina secretora y protectora de la glándula mamaria (Tizard, 2009). Es así como se genera la respuesta inmunológica a la mastitis. En consecuencia, esto podría resultar en un recuento de colonias más bajo en comparación con muestras donde el mecanismo inmunológico aún no ha tenido un efecto significativo en el manejo de la enfermedad.

### **Tabla 8**

*Recuento de UFC en placas sembradas.*

<b>Muestra</b>	<b>Recuento de colonias (UFC / 3 <math>\mu</math>L)</b>
172 (+)	523
168 (+)	68
200 (+)	307
192 (+)	226
150 (+)	350

Muestra	Recuento de colonias (UFC / 3 $\mu$ L)
149 (+)	33
144 (+)	223
199 (+)	486
147 (+)	489
185 (+)	295
163 (++)	248
133 (++)	420
181 (++)	96
103 (++)	400
187 (+++)	47

*Nota.* Se debe considerar que la inoculación fue 3  $\mu$ L de leche por placa.

#### **Descripción morfológica de las colonias bacterianas identificadas.**

Se detalló la descripción morfológica, de acuerdo con algunos de los criterios establecidos por (Guillen, 2020)., de las colonias bacterianas aisladas halladas en las muestras de leche positiva para mastitis.

Bajo este contexto, se aislaron 92 colonias (véase **anexo A**); sin embargo, la **tabla 9** muestra, únicamente, los aislados de interés (agentes causales de mastitis).

#### **Tabla 9**

*Resultados de la identificación morfológica macroscópica de las colonias bacterianas de las muestras de leche proveniente de vacas con mastitis.*

Muestra	Aislados hallados	Datos de morfología macroscópica
A (200)	A <sub>1</sub>	Mediana, circular, borde entero, opaca, color amarillo verdoso, lisa, convexa
	A <sub>3</sub>	Pequeña, circular, borde entero, opaca, no pigmentada (blanco cremoso), lisa, elevada

Muestra	Aislados hallados	Datos de morfología macroscópica
B (144)	A <sub>5</sub>	Pequeña, irregular, borde ondulado (aspecto de nube), opaca, color amarillo tenue, lisa, plana
	B <sub>2</sub>	Pequeña, circular, borde entero, opaca, color amarillo verdoso, lisa, convexa
	B <sub>3</sub>	Pequeña, circular, borde entero, opaca, color amarillo tenue con bordes blanquecinos, lisa, convexa
	B <sub>7</sub>	Pequeña, irregular, borde ondulado, transparente, no pigmentada (blanquecino transparente), lisa, plana
C (192)	C <sub>2</sub>	Pequeña, circular, borde entero, opaca, color amarillo verdoso, lisa, convexa
D (181)	D <sub>3</sub>	Pequeña, circular, borde entero, opaca, color amarillo verdoso, lisa, elevada
E (187)	E <sub>3</sub>	Mediana, circular, borde entero, opaca, color amarillento, lisa, convexa
F (199)	F <sub>3</sub>	Pequeña, circular, borde entero, opaca, color amarillento con borde blanquecino, lisa, elevada
G (103)	G <sub>1</sub>	Pequeña, circular, borde entero, opaca, color amarillo verdoso, lisa, convexa
H (168)	H <sub>3</sub>	Pequeña, circular, borde entero, opaca, brillante, color amarillo mostaza, lisa, convexa
I (172)	I <sub>2</sub>	Pequeña, circular, borde entero, opaca, color amarillo verdoso, lisa, convexa
	J <sub>1</sub>	Grande, circular, borde rizado, opaca, color amarillo verdoso, lisa, elevada
J (163)	J <sub>6</sub>	Pequeña, circular, borde entero, opaca, color amarillo tenue con centro amarillo mostaza, lisa, elevada
	K <sub>1</sub>	Mediana, circular, borde entero, opaca, color amarillo verdoso, lisa, elevada
L (147)	L <sub>1</sub>	Grande, circular, borde entero, opaca, brillante, color amarillo mostaza con centro amarillo claro, lisa, elevada
	L <sub>8</sub>	Pequeña, circular, borde entero, opaca, color amarillo verdoso, lisa, elevada
M (149)	M <sub>1</sub>	Grande, irregular, borde rizado, opaca, sin brillo, no pigmentada (blanco tenue), lisa, plana

Muestra	Aislados hallados	Datos de morfología macroscópica
N (185)	M <sub>2</sub>	Grande, circular, borde ondulado, opaca, no pigmentada (blanca tenue), lisa, plana
N (185)	N <sub>4</sub>	Puntiforme, circular, borde entero, transparente, brillante, no pigmentada (blanquecina azulada), lisa, plana
O (133)	O <sub>3</sub>	Pequeña, circular, borde entero, opaca, brillante, color en el centro amarillento pálido con bordes blanquecinos, lisa, elevada

*Nota.* Se consideraron los criterios: tamaño, forma, borde, transparencia, brillo color, textura y elevación. Se designó una letra para las diferentes muestras, mejorando la nomenclatura de los aislados.

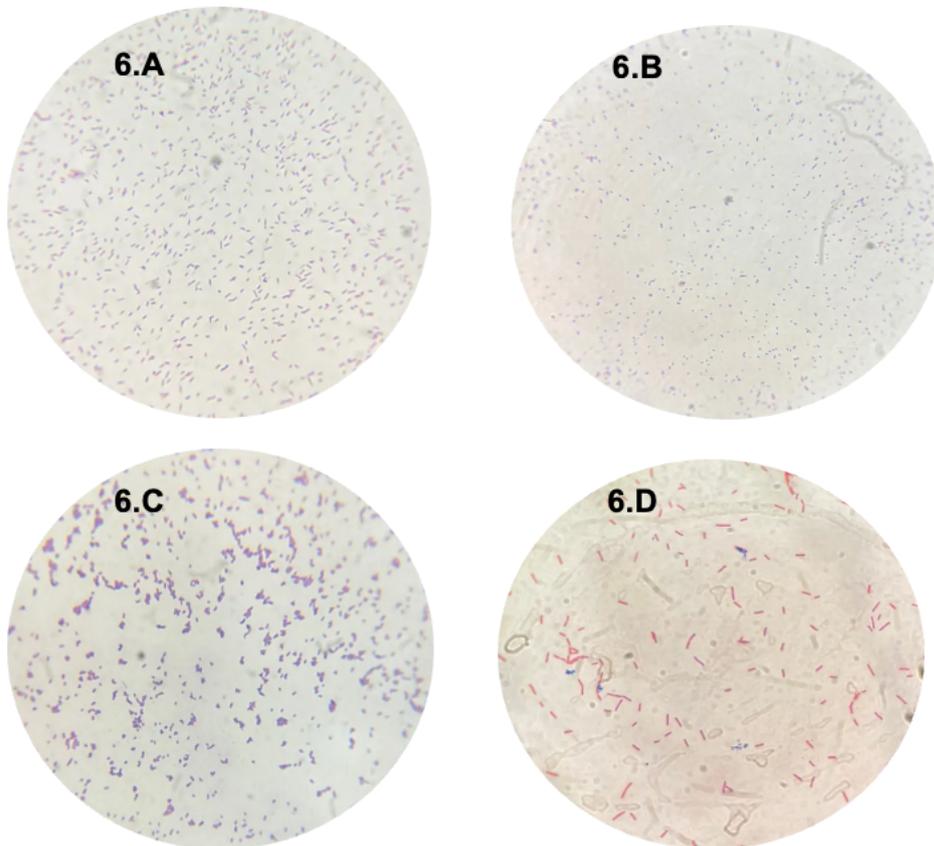
#### **Identificación bioquímica y morfología microscópica para diferenciar géneros bacterianos que causan mastitis.**

##### ***Tinción gram.***

Los microorganismos gram+ que dan indicio a la inflamación mamaria son *Streptococcus* y *Staphylococcus*, mientras que *Escherichia coli* y *Klebsiella spp.* son microorganismos gram- que, al igual que las mencionadas previamente, causan mastitis en el ganado vacuno (Wollowski, Bertulat, Kossatz, & Heuwieser, 2019)., (Haxhijaj, Wishart, & Ametaj, 2022). Aquello se refleja en los resultados obtenidos en el presente estudio, donde los agentes causantes de mastitis incluyen bacterias grampositivas (gram+) y gramnegativas (gram-), que se tiñen de morado y rosado, respectivamente, con morfología de bacilos y cocos (véase **figura 6** y **anexo B**).

**Figura 6**

*Algunos aislados bacterianos teñidos de acuerdo con la prueba de Gram.*



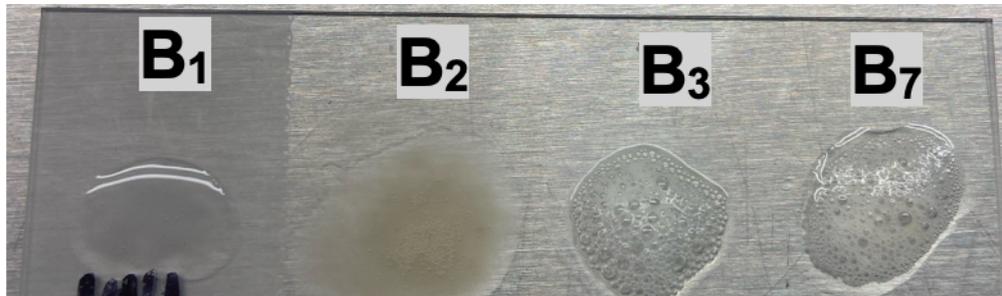
*Nota.* Imagen observada bajo lente de aumento 100 X del microscopio óptico (Zeiss). Se visualizan algunas bacterias gram positivas con morfología de bacilos (6.A) y cocos, similar a estreptococos (6.B) y estafilococos (6.C), y bacterias gram negativas con morfología de bacilos (6.D).

***Prueba de catalasa.***

Con base a la actividad bioquímica de *Staphylococcus*, otro agente causal de mastitis cuyos resultados son positivos para la prueba de catalasa (Pumipuntu, et al., 2017), se determinó que, posiblemente, este sea uno de los géneros que provoca la inflamación en la población muestreada, dado que 44 aislados microbianos indicaron la presencia de enzima catalasa, demostrando su capacidad de descomponer  $H_2O_2$  (véase **figura 7, tabla 10 y anexo B**).

### Figura 7

Resultados ante la prueba de catalasa en aislados bacterianos.



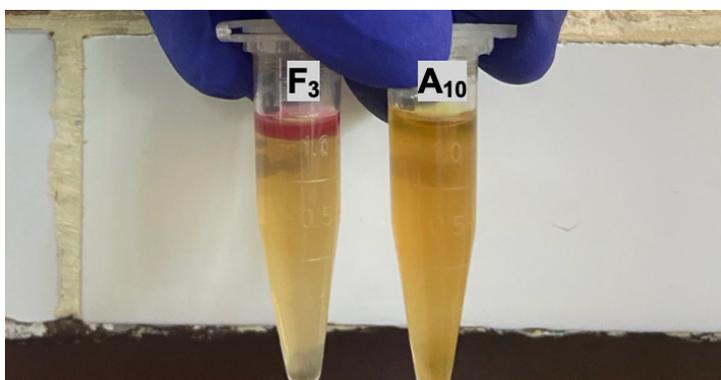
Nota. El burbujeo señaló presencia de enzima catalasa en el aislado, arrojando resultados positivos en los aislados B<sub>3</sub> y B<sub>7</sub>, mientras que los aislados B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> fueron negativos.

### Prueba de indol.

En caso de que un aislado bacteriano sea indol negativo, al adicionar el reactivo de Kovacs, la capa de esta sustancia se mantiene amarilla o turbia; caso contrario, se evidencia un anillo rosa-rojizo (prueba indol positiva). La prueba de indol se emplea para distinguir *E. coli* de *Klebsiella* o *Enterobacter* (MacFaddin, 2000)., (York, Baron, Clarridge, Thomson, & Weinstein, 2000). En consecuencia, posiblemente el aislado F<sub>3</sub> corresponde a *E. coli*, ya que demostró su capacidad de oxidar triptófano y formar metabolitos secundarios, entre ellos, el indol (véase **figura 8**). No obstante, se requiere realizar más ensayos bioquímicos, como siembra en EMB para establecer si, en efecto, es dicho microorganismo.

### Figura 8

Resultados ante la prueba de indol en aislados bacterianos.



Nota. El anillo rosa señaló la reacción del indol producido por la oxidación del triptófano debido a la actividad metabólica de la bacteria. El aislado F<sub>3</sub> fue el único resultado positivo

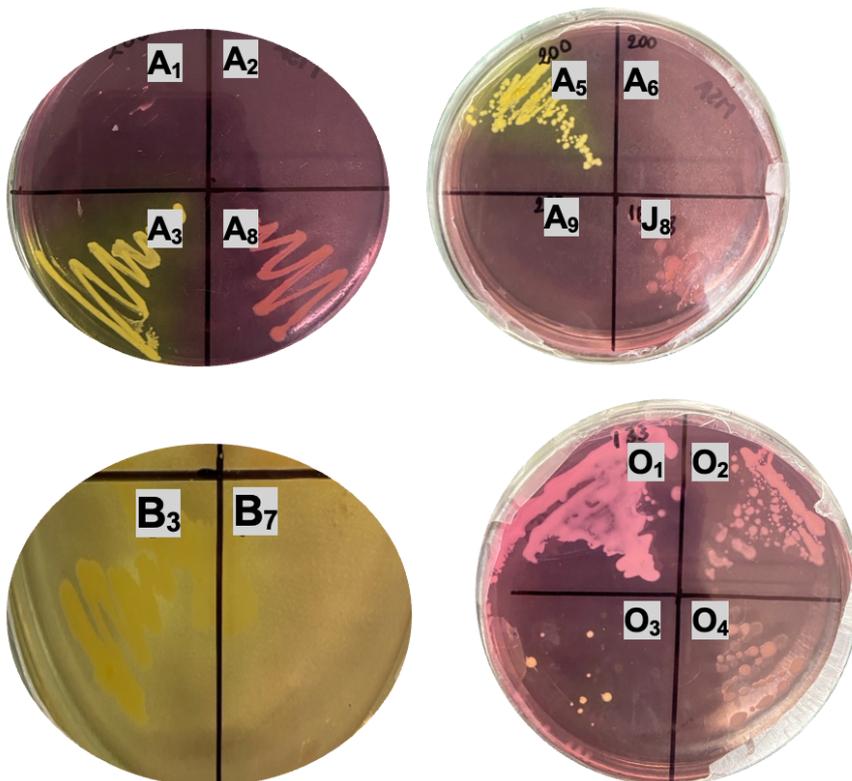
para la prueba de indol, mientras que A<sub>10</sub> es uno de los 92 aislados que fueron negativos para el test mencionado.

***Prueba de fermentación de manitol.***

Las pruebas en agar manitol salado (MSA) permiten diferenciar *S. aureus* de otras especies bacterianas, pues esta fermenta manitol y produce ácido, el cual provoca un cambio de color en el medio (rojo a amarillo) (Pumipuntu, et al., 2017). Con base a los resultados obtenidos (véase **figura 9**), se estableció que los aislados A<sub>3</sub>, A<sub>5</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>7</sub>, O<sub>3</sub> emplean manitol como fuente de carbono para producir ácido como producto metabólico. Al ser positivos para catalasa y fermentación de manitol, gram+ con forma de cocos, se determinó que el organismo es *Staphylococcus aureus*.

**Figura 9**

*Resultados de la prueba de fermentación de manitol empleando MSA para identificar Staphylococcus.*



*Nota.* El cambio de color rojo a amarillo indica que las colonias fermentan manitol, de forma que los aislados A<sub>3</sub>, A<sub>5</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>7</sub> y O<sub>3</sub> fueron positivos, mientras que los aislados A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>6</sub>, A<sub>8</sub>, A<sub>9</sub>, J<sub>8</sub>, O<sub>1</sub>, O<sub>2</sub> y O<sub>4</sub> se catalogaron como negativos.

### **Prueba de fermentación de lactosa.**

El agar eosina azul de metileno se caracteriza por ser un medio diferencial y selectivo empleado para identificar microorganismos gram- que fermentan lactosa, como *Escherichia coli*, uno de los agentes causales de mastitis más común (Leininger, Roberson, & Elvinger, 2001)., (Suge, Magu, & Wanzala, 2023). La pigmentación de las colonias aisladas fue imprescindible para la diferenciación de *E. coli*, pues estas se caracterizaron por adquirir una coloración verdosa brillante y metálica, la cual surge a raíz de la producción de ácido por parte de la bacteria en cuestión (Suge, Magu, & Wanzala, 2023)., como denota el aislado F<sub>3</sub> (véase **figura 10**).

Adicionalmente, *E. coli* es un patógeno que descompone el triptófano para producir indol, de modo que es indol-positivo y, a su vez, produce catalasa para descomponer el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sin embargo, es incapaz de fermentar manitol. Estas características bioquímicas fueron necesarias para distinguir esta especie bacteriana (MacFaddin, 2000). Con base en los resultados de dichas pruebas bioquímicas, se facilitó la caracterización de *E. coli* como agente causal de mastitis en el aislado F<sub>3</sub>.

### **Figura 10**

*Resultados de la prueba de fermentación de lactosa utilizando EMB para diferenciar E. coli en el aislado F<sub>3</sub>.*



*Nota.* El crecimiento bacteriano acompañado de un brillo metálico verdoso indica que la prueba es positiva para fermentación de lactosa.

La **tabla 10** presenta un resumen de las pruebas bioquímicas realizadas, únicamente mostrando los agentes causales de mastitis, donde se identificaron cinco agentes causales de mastitis bacteriana: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *E. coli* y *Bacillus spp.* El género que estuvo presente en más de la mitad de las muestras tomadas fue *P. aeruginosa*, mientras que *E. coli* existió en una sola muestra (véase **tablas 10 y 11**).

**Tabla 10**

*Resultados de la tinción Gram y las pruebas bioquímicas realizadas en los aislados.*

Numeración del aislado	Tinción Gram	Catalasa	Indol	F. de manitol salado	F. lactosa	Morfología microscópica	Posible género bacteriano
A <sub>1</sub>	-	+	-	-	-	Bacilos	<i>P. aeruginosa</i>
A <sub>3</sub>	+	+	-	+	-	Estafilococos	<i>S. aureus</i>
A <sub>5</sub>	+	+	-	+	-	Estafilococos	<i>S. aureus</i>
B <sub>2</sub>	-	+	-	-	-	Bacilos	<i>P. aeruginosa</i>
B <sub>3</sub>	+	+	-	+	-	Estafilococos	<i>S. aureus</i>
B <sub>7</sub>	+	+	-	+	-	Estafilococos	<i>S. aureus</i>
C <sub>2</sub>	-	+	-	-	-	Bacilos	<i>P. aeruginosa</i>
D <sub>3</sub>	-	+	-	-	-	Bacilos	<i>P. aeruginosa</i>
E <sub>3</sub>	+	-	-	-	-	Estreptococos	<i>Streptococcus spp.</i>
F <sub>3</sub>	-	+	+	-	+	Bacilos	<i>E. coli</i>
G <sub>1</sub>	-	+	-	-	-	Bacilos	<i>P. aeruginosa</i>
H <sub>3</sub>	+	-	-	-	-	Estreptococos	<i>Streptococcus spp.</i>
I <sub>2</sub>	-	+	-	-	-	Bacilos	<i>P. aeruginosa</i>
J <sub>1</sub>	-	+	-	-	-	Bacilos	<i>P. aeruginosa</i>
J <sub>6</sub>	+	-	-	-	-	Estreptococos	<i>Streptococcus spp.</i>
K <sub>1</sub>	-	+	-	-	-	Bacilos	<i>P. aeruginosa</i>
L <sub>1</sub>	+	-	-	-	-	Estreptococos	<i>Streptococcus spp.</i>
L <sub>8</sub>	-	+	-	-	-	Bacilos	<i>P. aeruginosa</i>
M <sub>1</sub>	+	-	-	-	-	Estreptococos	<i>Streptococcus spp.</i>
M <sub>2</sub>	+	+	-	-	-	Bacilos	<i>Bacillus spp.</i>
N <sub>4</sub>	+	+	-	-	-	Bacilos	<i>Bacillus spp.</i>
O <sub>3</sub>	+	+	-	+	-	Estafilococos	<i>S. aureus</i>

*Nota.* Se colocó '+' cuando la prueba es positiva y '-' cuando es negativo. Se colocó 'F.' en lugar de 'Fermentación'. Las letras representan a cada muestra: A (200), B (144), C (192), D (181), E (187), F (199), G (103), H (168), I (172), J (163), K (150), L (147), M (149), N (185), O (133); y los subíndices a la colonia aislada.

Tanto las características bioquímicas, como la coloración en agar nutriente, influyó en la determinación de *P. aeruginosa*, pues, al igual que en el estudio de (Rai, et al., 2017), los aislados A<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, G<sub>1</sub>, I<sub>2</sub>, J<sub>1</sub>, K<sub>1</sub> y L<sub>8</sub> presentaron colonias amarillas verdosas al cultivarse en agar nutriente (véase **tabla 9**). Cabe destacar que *P. aeruginosa* es un patógeno asociado a la infección intramamaria (mastitis), siendo así uno de los tres causantes más usuales, junto con *E. coli* y *S. aureus* (Schauer, Wald, Urbantke, Loncaric, & Baumgartner, 2021), (Park, et al., 2007). En contraste con dichos resultados, la presente investigación determinó que *Streptococcus spp.* fue más común en los aislados que *E. coli* (véase **tabla 11**), quien se encontró una sola vez en los 92 aislados realizados.

**Tabla 11**

*Agentes bacterianos que provocan mastitis hallados en las diferentes muestras de leche.*

Muestras	Especies bacterianas halladas				
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Streptococcus spp.</i>	<i>E. coli</i>	<i>Bacillus spp.</i>
A (200)	X	X			
B (144)	X	X			
C (192)	X				
D (181)	X				
E (187)			X		
F (199)				X	
G (103)	X				
H (168)			X		
I (172)	X				

Muestras	Especies bacterianas halladas				
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Streptococcus spp.</i>	<i>E. coli</i>	<i>Bacillus spp.</i>
J (163)	X		X		
K (150)	X				
L (147)	X				
M (149)			X		X
N (185)					X
O (133)		X			

*Nota.* Las 'X' representa la presencia de dicho género bacteriano en la muestra señalada.

Aunque *Bacillus spp.* no es asociado con mastitis, se han reportado casos en los que se ha considerado este género como agente causal de la infección (Fossum, Herikstad, Binde, & Pettersen, 1986)., hecho que coincide con los resultados obtenidos, en los que los aislados M<sub>2</sub> y N<sub>4</sub> presentaron características de la especie en cuestión, siendo gram+, positivos a catalasa y negativos a pruebas de indol, fermentación de manitol salado y de lactosa (véase **tabla 10** y **11**).

#### ***Perfil lipídico de leche proveniente de vacas con y sin mastitis***

##### **Porcentaje de grasa de las muestras de leche.**

La **tabla 12** señala las muestras de leche con mastitis, donde se requirió mayor cantidad de este líquido para alcanzar un porcentaje de grasa similar al obtenido en las muestras sin MSC.

**Tabla 12**

*Porcentaje de grasa en las muestras de leche positiva y negativa para mastitis*

Muestra	Cantidad de leche (g)	Porcentaje de grasa
157 (-)	3,164	1,0524
175 (-)	3,0653	1,142

<b>Muestra</b>	<b>Cantidad de leche (g)</b>	<b>Porcentaje de grasa</b>
152 (-)	3,0818	1,0319
148 (-)	3,0467	1,0940
173 (-)	3,0766	1,105
96 (-)	3,129	1,000
178 (-)	3,0313	1,0995
191 (-)	2,568	1,747
125 (-)	3,118	1,0171
172 (+)	4,624	1,142
168 (+)	4,791	1,0747
200 (+)	3,138	1,142
192 (+)	4,606	1,137
150 (+)	4,642	1,110
149 (+)	4,611	1,120
144 (+)	3,108	1,0909
199 (+)	4,881	1,0792
147 (+)	3,240	1,0758
185 (+)	4,657	1,118
163 (++)	4,674	1,177
133 (++)	4,602	1,171
181 (++)	3,0972	1,179
103 (++)	4,608	1,215
187 (+++)	4,575	1,209

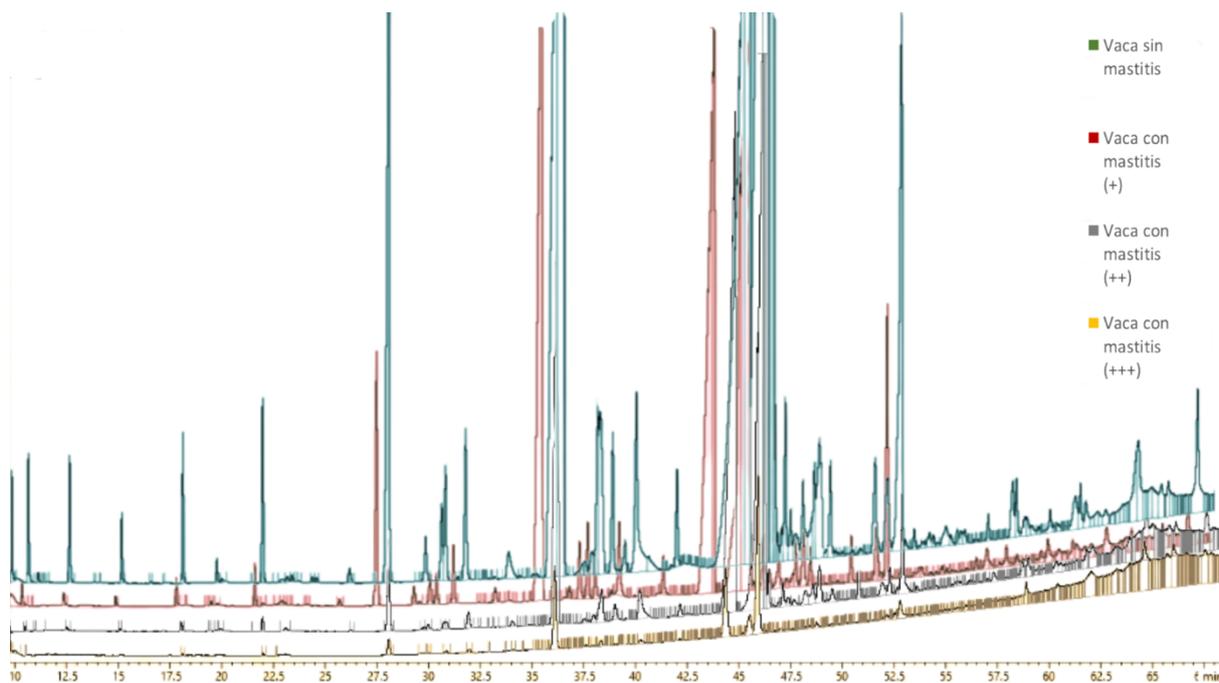
*Nota.* Los símbolos ‘-’ y ‘+’ situados a la par del número de muestra, representa la lectura de la prueba CMT para determinación de mastitis en la vaca muestreada.

### Análisis cromatográfico de las muestras de leche con y sin MSC.

En cuanto al análisis del perfil lipídico, los cromatogramas evidenciaron la escasez de los ácidos grasos en muestras de leche proveniente de vacas con mastitis, a comparación de las muestras sin la infección (véase **figura 11** y **anexo C**).

#### Figura 11

*Cromatogramas de muestras sin la inflamación (-) y con los diferentes grados de mastitis (+, ++ y +++).*



*Nota.* Cada pico corresponde a un ácido graso específico.

A pesar de que existe evidencia que señala que los ácidos grasos (AG) actúan como fuente de energía para bacterias (Sasikala & Ramana, 1998)., (Xu, et al., 2021)., no hay información que indique que los microorganismos causantes de mastitis empleen ciertos AG a modo de fuente de carbono y esa sea la razón por la que, en los cromatogramas analizados, algunos picos de ácidos grasos desaparecen. En consecuencia, es importante efectuar más estudios sobre la interacción entre las bacterias que provocan mastitis y los ácidos grasos de la leche.

En contraposición a los resultados obtenidos en este estudio, en el que se presenció un cambio significativo entre el perfil lipídico de leche procedente de vacas con MSC y sin

mastitis, se halla la investigación realizada por (Hunt, et al., 2013)., donde asegura que la mastitis no se asocia con las alteraciones en la síntesis de grasa láctea, señalando así que no hay diferencia significativa en los perfiles de lípidos totales o ácidos grasos.

Con respecto a la **tabla 13**, se señalan los ácidos grasos existentes en muestras de leche con y sin MSC, demostrando que los picos que aparecen con mayor frecuencia en los cromatogramas de leche infectada pertenecen a los ácidos mirístico, palmítico, esteárico y oleico. Asimismo, son quienes se mantuvieron en concentraciones más altas en los perfiles lipídicos de leche procedente de vacas con MSC (véase **anexo C y D**).

**Tabla 13**

*Ácidos grasos existentes en las muestras de leche positiva y negativa para mastitis.*

Ácidos grasos	Grado de mastitis			
	(-)	(+)	(++)	(+++)
Ácido butírico	152, 148, 178, 191, 125	*	*	*
Ácido caproico	157, 175, 152, 148, 96, 178, 191, 125	172, 192, 150, 149	*	*
Ácido caprílico	157, 152	*	*	*
Ácido cáprico	157, 175, 152, 148, 173, 96, 178, 191, 125	172, 192, 150, 149	*	*
Ácido mirístico	157, 175, 152, 148, 173, 96, 178, 191, 125	172, 168, 192, 150, 149, 144	163, 133, 181	187
Ácido miristoleico	157, 175, 152, 148, 96, 178, 125	172, 149	*	*
Ácido pentadecanoico	175, 152, 148, 96, 125	172, 192, 150, 149	*	*

Ácidos grasos	Grado de mastitis			
	(-)	(+)	(++)	(+++)
Ácido palmítico	157, 175, 152, 148, 173, 96, 178, 191, 125	172, 168, 200, 192, 150, 149, 144, 199, 147	163, 133, 181, 103	187
Ácido palmitoleico	152, 191	192, 150	*	*
Ácido heptadecanoico	157, 152, 173, 178, 191, 125	192, 150	*	*
Ácido cis-10-heptadecenoico	125	*	*	*
Ácido esteárico	152, 96	168, 200, 192, 150, 149, 144, 199, 147	103	*
Ácido elaídico	157, 96	172, 168, 149, 144	163, 133, 181	187
Ácido oleico	157, 175, 152, 148, 173, 96, 178, 191, 125	172, 168, 200, 192, 150, 149, 144, 199, 147	163, 133, 181, 103	187
Ácido linolelaídico	157, 175, 152, 173, 191, 125	172	*	*
Ácido linoleico	157, 152	192, 150	*	*
Ácido araquídico	*	192, 150, 149	181	*
Ácido $\gamma$ -linolénico	178	192, 150	*	*
Ácido cis-11-eicosenoico	175, 152, 96, 178, 125	172, 168, 192, 149, 144	133	*
Ácido linolénico	173	*	*	*
Ácido erúcico	148	*	*	*
Ácido tricosanoico	148	*	*	*
Ácido cis-13,16-docosadienoico	152	*	*	*
DHA	157, 175, 152, 148, 173, 178, 191, 125	*	*	*

*Nota.* Los números en las columnas corresponden al número de muestra, '+' simboliza el estado de la enfermedad y '-' la inexistencia de mastitis en la vaca. Los '\*' en algunas celdas

representan la inexistencia de muestras con esos ácidos grasos en el grupo analizado. Se colocó 'DHA' en lugar de 'ácido docosahexaenoico'.

Como indica la **tabla 13**, las muestras con la infección: 168 y 144; 200, 199, 147 y 103; y 163 y 187, compartieron, exactamente, los mismos ácidos grasos entre ellos. Este acontecimiento se repitió entre las muestras 150 y 192, con la excepción que la última de estas presenta ácido cis-11-eicosenoico. Del mismo modo, las muestras 181 y 133 se diferenciaron únicamente en dos ácidos grasos, ya que la primera dispone de ácido araquídico en su perfil lipídico, mientras que 181 carece de dicho componente, pero, al igual que la muestra 192, posee ácido cis-11-eicosenoico; y, por último las muestras 172 y 149 se distinguen únicamente en el ácido linolelaídico y los ácidos esteárico y araquídico, quienes pertenecen a cada muestra, respectivamente (véase **figura 12**).

Es así que existen 6 grupos de muestras con MSC cuyos ácidos grasos son iguales (véase **tabla 14**), pero que difieren en el grado de mastitis y el microorganismo que causa la infección, por lo que se presume que la variación de la composición lipídica está relacionada con una respuesta inmunológica del organismo de la vaca ante la enfermedad, demostrando la compleja relación entre la inmunidad, inflamación y el estrés metabólico a raíz de la mastitis, como lo demuestra (Khan, et al., 2024).

En adición, el estudio de (Khan, et al., 2024) señaló que al suscitarse desequilibrios en los lípidos y estimular la respuesta inmune ante una infección inflamatoria, como la mastitis, se provocó estrés oxidativo y se activó la señalización del factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), el cual se implica en la respuesta inmunológica de tipo celular ante el estrés y los antígenos bacterianos, lo cual abrió la posibilidad de que la desaparición de los ácidos grasos se explique como una respuesta inmune.

**Tabla 14**

*Agrupaciones de muestras con MSC (+, ++ y +++) de acuerdo con los ácidos grasos que comparten entre ellas.*

<b>Muestras con los mismos componentes en su perfil lipídico</b>			
	<b>Grado de mastitis</b>		
	<b>+</b>	<b>++</b>	<b>++</b>
<b>Grupo A</b>	168, 144		
<b>Grupo B</b>	200, 199, 147	103	
<b>Grupo C</b>		163	187
<b>Grupo D</b>		133, 181	
<b>Grupo E</b>	150, 192		
<b>Grupo F</b>	172, 149		

**Figura 12**

*Ácidos grasos compartidos entre las unidades experimentales agrupadas.*

	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Grupo E	Grupo F
<b>Componente</b>	168 (+), 144 (+)	200 (+), 199 (+), 147 (+), 103 (++)	163 (++) , 187 (+++)	133 (++)	181 (++)	192 (+)
Ácido caproico						
Ácido cáprico						
Ácido mirístico						
Ácido miristoleico						
Ácido pentadecanoico						
Ácido palmítico						
Ácido palmítoleico						
Ácido heptadecanoico						
Ácido esteárico						
Ácido eláídico						
Ácido oleico						
Ácido linolelaídico						
Ácido linoleico						
Ácido araquídico						
Ácido γ-linolénico						
Ácido cis-11-eicosenoico						

*Nota.* Los recuadros coloreados demuestran la existencia del ácidos graso señalado en la composición lipídica de las muestras.

Asimismo, se indicó que, al existir una señalización desregulada por la reacción inflamatoria, surge un aumento en la producción del TNF- $\alpha$  y el estrés oxidativo, hecho que estimula la descomposición excesiva de grasas (Khan, et al., 2024). Aquello explicó, desde

una perspectiva inmunológica, por qué existe menor cantidad de ácidos grasos en muestras que atraviesan un proceso inflamatorio (positivas para MSC), pero no por qué las muestras coincidentes en composición lipídica no presentaron un estadio similar de mastitis (+, ++ o +++) o igualdad entre sus agentes causales.

### Análisis estadístico

**Tabla 15**

*Porcentaje de ácido graso en la grasa de leche proveniente de vacas sin mastitis*

Ácidos grasos	Muestras sin mastitis								
	157	175	152	148	173	96	178	191	125
Ácido butírico	0,00	0,00	12,27	15,55	0,00	0,00	33,88	9,56	24,92
Ácido caproico	2,14	1,92	3,28	5,86	0,00	1,42	8,35	2,83	6,44
Ácido caprílico	0,25	0,00	0,40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ácido cáprico	1,72	1,37	1,53	4,13	1,35	0,96	3,32	1,33	2,59
Ácido mirístico	6,29	4,97	6,42	18,52	0,69	3,27	11,56	4,35	8,19
Ácido miristoleico	3,20	1,47	2,53	1,65	0,00	0,67	1,88	0,00	2,26
Ácido pentadecanoico	0,00	1,02	1,35	3,03	0,00	0,76	0,00	0,00	1,22
Ácido palmítico	3,17	15,98	17,03	2,61	11,67	11,74	17,17	18,94	27,92
Ácido palmitoleico	0,00	0,00	0,46	0,00	0,00	0,00	0,00	1,34	0,00
Ácido heptadecanoico	0,86	0,00	0,77	0,00	0,75	0,00	1,62	0,59	0,73
Ácido cis-10-heptadecenoico	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,39
Ácido esteárico	0,00	0,00	0,86	0,00	0,00	4,55	0,00	0,00	0,00
Ácido elaídico	31,43	0,00	0,00	0,00	0,00	3,44	0,00	0,00	0,00
Ácido oleico	31,33	10,36	15,38	1,52	3,87	12,55	1,02	11,94	22,14
Ácido linolelaídico	3,88	5,73	7,74	0,00	14,18	0,00	0,00	10,86	3,52
Ácido linoleico	11,06	0,00	0,62	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ácido araquídico	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,91	0,00	0,00
Ácido $\gamma$ -linolénico	0,00	0,83	0,70	0,00	0,00	0,84	0,64	0,00	0,92

Ácidos grasos	Muestras sin mastitis								
	157	175	152	148	173	96	178	191	125
Ácido cis-11-eicosenoico	0,00	0,00	0,00	0,00	1,62	0,00	0,00	0,00	0,00
Ácido linolénico	0,00	0,00	0,00	0,61	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ácido erúcico	0,00	0,00	0,00	0,55	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ácido tricosanoico	0,00	0,00	0,52	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ácido cis-13,16- docosadienoico	0,86	0,89	0,96	0,88	0,89	0,00	1,06	0,96	1,03
DHA	0,00	0,00	12,27	15,55	0,00	0,00	33,88	9,56	24,92
<b>Ácidos grasos totales (por grupo)</b>	<b>23</b>								

*Nota.* El porcentaje se halla en función de la concentración en gramos de ácido graso presente en un g de grasa de la leche analizada. Se colocó 'DHA' en lugar de 'ácido docosahexaenoico'.

En las unidades experimentales analizadas, el grupo sin mastitis presenta mayor cantidad de ácidos grasos (véase **tabla 15**) en contraste con los grupos con la afección en cuestión (véase **tablas 16 y 17**). Por consiguiente, se estableció que el ganado diagnosticado con mastitis de grado 1 (+), 2 (++) y 3 (+++) presentó una diferencia de 7, 16 y 19 ácidos grasos, respectivamente, comparados con un animal sano.

**Tabla 16**

*Porcentaje de ácido graso en la grasa de leche proveniente de vacas con mastitis (+)*

Ácidos grasos	Muestras con mastitis (+)									
	172	168	200	192	150	149	144	199	147	185
Ác. caproico	1,74	0,00	0,00	2,70	1,59	2,15	0,00	0,00	0,00	0,00
Ác. cáprico	1,49	0,00	0,00	1,65	0,95	1,34	0,00	0,00	0,00	0,00
Ác. mirístico	3,44	0,85	0,00	4,74	3,18	4,10	0,70	0,00	0,00	0,00

Ácidos grasos	Muestras con mastitis (+)									
	172	168	200	192	150	149	144	199	147	185
Ác. miristoleico	1,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,70	0,00	0,00	0,00	0,00
Ác. pentadecanoico	1,06	0,00	0,00	1,06	0,77	0,80	0,00	0,00	0,00	0,00
Ác. palmítico	11,82	2,37	1,46	14,22	12,38	35,98	2,09	1,00	0,61	0,00
Ác. palmitoleico	0,00	0,00	0,00	1,09	0,79	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ác. heptadecanoico	0,00	0,00	0,00	0,85	0,69	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ác. esteárico	0,00	1,84	1,17	4,32	6,48	7,27	1,54	1,05	0,77	0,00
Ác. eláidico	10,33	0,65	0,00	0,00	0,00	3,68	0,57	0,00	0,00	0,00
Ác. oleico	5,73	2,80	1,63	17,06	16,66	9,87	2,89	1,47	0,78	0,00
Ác. linolelaídico	10,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ác. linoleico	0,00	0,00	0,00	0,60	0,54	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ác. araquídico	0,00	0,00	0,00	0,49	0,48	0,55	0,00	0,00	0,00	0,00
Ác. γ-linolénico	0,00	0,00	0,00	0,64	0,57	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ác. cis-11-eicosenoico	0,73	0,52	0,00	0,80	0,00	0,72	0,51	0,00	0,00	0,00
<b>Ácidos grasos totales (por grupo)</b>	16									

*Nota.* El porcentaje se halla en función de la concentración en gramos de ácido graso presente en un g de grasa de la leche analizada.

Se denotó que tres muestras de grado 1 (192, 150 y 149) poseen una concentración mayor de ácido esteárico en vacas con la patología que en bovinos sanos, lo cual coincide con los resultados de (Ceciliani, et al., 2021)., cuyo estudio determinó que dicho ácido es mayor en vacas con mastitis. Este ácido graso saturado de cadena larga interviene en la inhibición de la respuesta inmune dependiente de células T, reduciendo la capacidad

quimiotáctica de monocitos, un tipo de glóbulo blanco, por tanto, intercede en la migración de estos a los sitios de inflamación (Tebbey & Buttke, 1990).

Es así que dicho ácido, al ser anti-inflamatorio, interfiere en el proceso de control del patógeno causante de la enfermedad, prolongando así la infección, de modo que la concentración elevada de ácido esteárico en ganado con mastitis indicó que, posiblemente, los animales en cuestión tengan una respuesta inmunitaria menos efectiva, pues inhibe la acción de dicha célula crucial en la respuesta inmune.

En la **tabla 16** se sitúa la muestra 185, en la que, a diferencia del resto de unidades experimentales estudiadas, no se identificó ningún ácido graso. La inexistencia de material lipídico en la muestra podría surgir por la respuesta individual de la vaca, el cual se pierde completamente al adquirir la infección; aunque existen otros factores que determinan aquello, como la alimentación y edad.

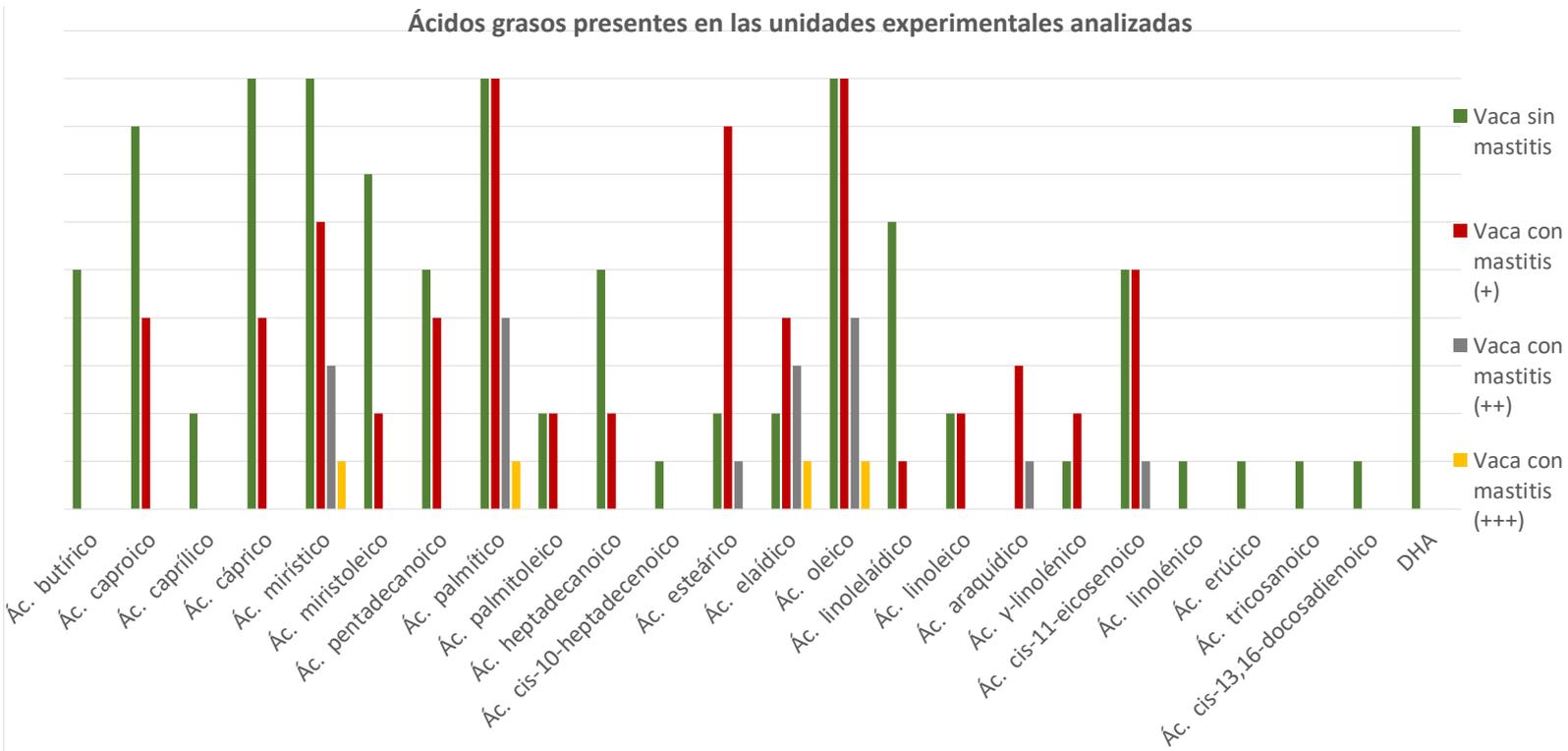
**Tabla 17**

*Porcentaje de ácido graso en la grasa de leche proveniente de vacas con mastitis (++) y (+++).*

Ácidos grasos	Muestras con mastitis (++)				Muestra con mastitis (+++)
	163	133	181	103	187
Ác. mirístico	0,47	1,55	0,76	0,00	0,45
Ác. palmítico	1,33	7,00	1,32	1,02	1,20
Ác. esteárico	0,00	0,00	0,00	1,01	0,00
Ác. elaídico	1,31	6,48	0,88	0,00	0,78
Ác. oleico	1,81	9,04	0,87	1,46	1,55
Ác. araquídico	0,00	0,00	0,48	0,00	0,00
Ác. cis-11-eicosenoico	0,00	0,60	0,00	0,00	0,00
<b>Ácidos grasos totales</b>					
<b>(por grupo)</b>		7			4

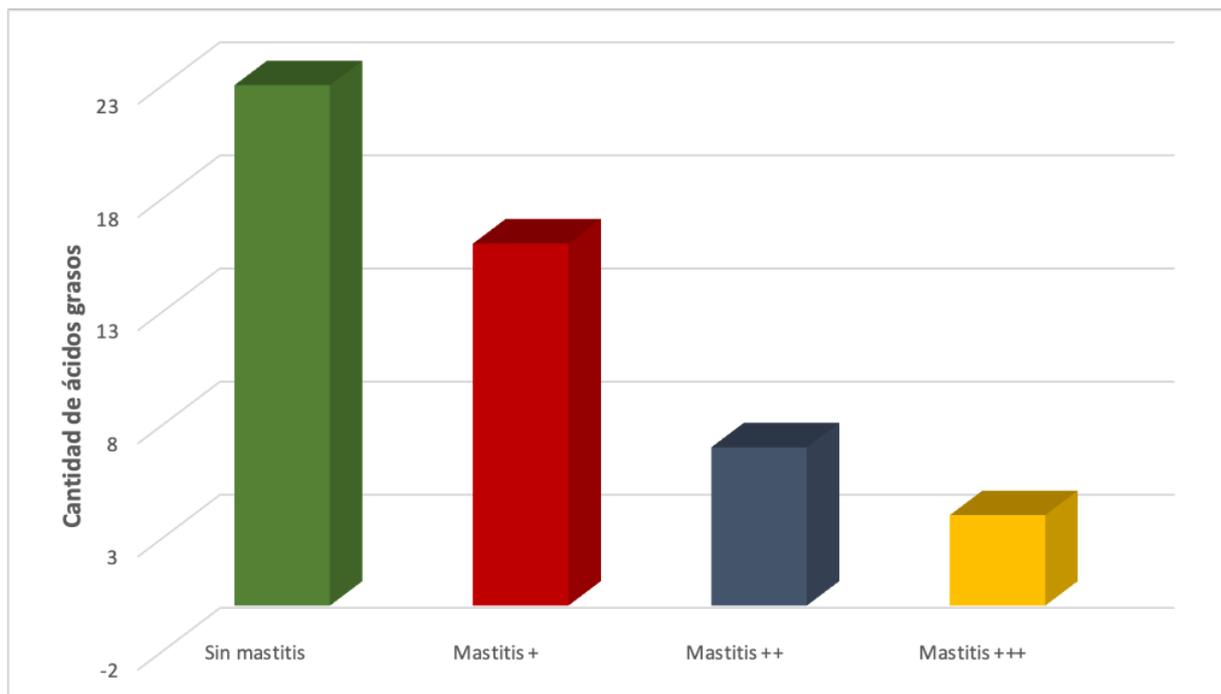
**Figura 13**

Diagrama de barras para comparar el perfil lipídico total entre vacas sanas y enfermas



**Figura 14**

Diagrama de barras que muestra los ácidos grasos totales por unidad experimental analizada.



Las **tablas 15, 16 y 17**, así como las **figuras 13 y 14**, destacaron la diferencia entre la cantidad de ácidos grasos en muestras procedentes de vacas enfermas y sin la afección. De esta manera, se determinó que el grado de la patología incidió en la pérdida de dichos lípidos, siendo, al igual que las bacterias patológicas, un aspecto importante para decrecer la calidad nutricional de la leche.

## 5. Conclusiones y recomendaciones

En conclusión, se determinó el plan de muestreo para identificar casos de mastitis en el ganado bovino dentro del área estudiada (Universidad de las Fuerzas Armadas), de forma que se aplicaron criterios de exclusión e inclusión para delimitar de forma apropiada el presente trabajo. Aplicando el CMT, se hallaron 9 vacas sanas, mientras que el resto de los animales (15) presentaron mastitis de diferentes grados. Las 24 vacas lactantes se analizaron en el presente documento.

En definitiva, el perfil lipídico de la leche es alterado por la presencia de mastitis, de modo que la cantidad y concentración de ácidos grasos que se hallaron en muestras provenientes de vacas sanas superaron, en gran medida, a los que se encontraron en leche de vacas con la inflamación, existiendo diferencia significativa entre los perfiles lipídicos. En adición, el estudio demostró que, conforme es más crítico el grado de mastitis (+, ++ o +++), menor cantidad de ácidos grasos hubo en la composición láctea.

Por otra parte, se señaló que la alta concentración de ácido esteárico interfiere en la respuesta inmunitaria contra las bacterias patológicas causantes de mastitis, de manera que alarga la infección, por lo que se estableció que dicho ácido es un analito importante en muestras con mastitis y, para posteriores estudios, al evidenciar elevada cantidad de este ácido graso, es necesario aplicar tratamientos que contrarresten su efecto y, a su vez, promuevan la erradicación de mastitis para evitar distribuir leche con bajo contenido nutricional.

Se establecieron como agentes causales de mastitis a *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *E. coli* y *Bacillus spp.*, donde *P. aeruginosa* y

*Streptococcus spp.* fueron los microorganismos que se presentan de manera más común, hallándose la primera de estas especies en más de la mitad de las vacas infectadas y la segunda en 4 vacas, mientras que *S. aureus* se detectó en 3 muestras, *Bacillus spp.* en 2 y *E. coli* en un solo animal con la infección.

Se recomienda acoplar un muestreador automático (autosampler) al GC-FID, de forma que se agilice el análisis periódico de las muestras deseadas. Además, sería apropiado realizar el estudio del perfil lipídico mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), ya que la sensibilidad y especificidad que este equipo otorga en la identificación individual de componentes volátiles es más elevada que el GC-FID.

Adicionalmente, se recomienda continuar la investigación con un enfoque en el análisis de la respuesta metabólica de vacas infectadas mediante transcriptómica y proteómica para identificar genes y proteínas que interfieren durante la infección, usando herramientas bioinformáticas para adquirir más información sobre las vías metabólicas que se involucran en la mastitis. Esencialmente, esto ayudaría a entender el impacto de la enfermedad en el organismo y comprender la respuesta inmunológica del animal para hacer frente al estrés biológico, que surge por las bacterias causantes de mastitis.

Asimismo, se recomienda realizar la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con primers específicos y secuenciar el producto, de forma que se identifique a nivel de especie las bacterias causantes de mastitis, permitiendo caracterizar la diversidad microbiana en las muestras de leche infectadas.

## 6. Referencias bibliográficas

Albert, B., Tullis, T., & Tedesco, D. (2010). Planning the study. En *Beyond the Usability Lab Conducting Large-scale Online User Experience Studies* (pp. 17-47).

<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374892-8.00002-8>. ISBN: 978-0-12-374892-8

Akers, R. (2017). A 100-Year Review: Mammary development and lactation. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 10332-10352. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12983>.

- Anand, V., Jaswal, A., Kancharla, S., Kolli, P., Mandadapu, G., Kumar, S., & Mohanty, A. (2022). Critical Review on Physiological and Molecular Features during Bovine Mammary Gland Development: Recent Advances. *Cells*, *11*(20), 2-22. <https://doi.org/10.3390/cells11203325>.
- Baquerizo, V., & Córdova, V. (2022). Impacto económico del sector lácteo: un estudio de los gastos publicitarios y las ventas en tiempos de pandemia. *CEIT Digital Publisher*, *7*(6-1), 310-321.
- Bewley, J., Harmon, R., Locke, S., & Arnold, M. (2010). Collection and Preparation of Milk Samples for Microbiological Culturing. *Family and Consumer Sciences. Agriculture and Natural Resources (ANR)*, <http://www2.ca.uky.edu/agc/pubs/id/id180/id180.pdf>.
- Biswas, S., Banerjee, S., Baker, G., Kuo, C.-Y., & Chowdhury, I. (2022). The Mammary Gland: Basic Structure and Molecular Signaling during Development. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(7), <https://doi.org/10.3390/ijms23073883>.
- Boundless. (2013). 6.3C: Selective and Differential Media. In Boundless, *Microbiology* (pp. 512-513). Kindle Edition.
- Bylund, G. (1995, August 06). *Dairy processing handbook*. Retrieved from Tetra Pak: [https://diaspereira.weebly.com/uploads/5/6/3/9/5639534/dairy\\_handbook.pdf](https://diaspereira.weebly.com/uploads/5/6/3/9/5639534/dairy_handbook.pdf)
- Ceciliani, F., Audano, M., Addis, M. F., Lecchi, C., Ghaffari, M., Albertini, M., . . . Bronzo, V. (2021). The untargeted lipidomic profile of quarter milk from dairy cows with subclinical intramammary infection by non-aureus staphylococci. *Journal Of Dairy Science*, *104*(9), 10268-10281. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19975>.
- Cheng, W., & Han, S. (2020). Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments — A review. *Asian-australasian Journal of Animal Sciences*, *33*(11), 1699-1713. <https://doi.org/10.5713/ajas.20.0156>.
- Colette, C., & Monnier, L. (2011). Acides gras: classification, fonction et équilibre entre les différentes familles: Fatty acids: Classification, function and balance between the different families. *Médecine des Maladies Métaboliques*, *5*(3), 237-245. [https://doi.org/10.1016/S1957-2557\(11\)70234-6](https://doi.org/10.1016/S1957-2557(11)70234-6).

- Cortêz, M., Duarte, M., & De Melo, L. (2021). Chapter 1 - Relevant factors for raw milk quality for dairy foods manufacture. In A. Gomes da Cruz, C. Ranadheera, F. Nazzaro, & A. Mortazavian, *Dairy Foods: Processing, Quality, and Analytical Techniques* (pp. 1-17). Sawston: Woodhead Publishing.
- Daruna, J. (2012). Chapter 10 - Immune Activity and Psychopathology. In J. Daruna, *Introduction to Psychoneuroimmunology (Second Edition)* (pp. 211-248). Cambridge: Academic Press.
- Delgadillo, D. (2016). Lactancia: la firma de los mamíferos. *Apuntes de Ciencia & Sociedad*, 6(1), 62-69. <https://doi.org/10.18259/acs.2016011>.
- Erkmen, O. (2021). Gram staining technique. In O. Erkmen, *Laboratory Practices in Microbiology* (pp. 99-105. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-91017-0.00028-7>). Gaziantep: Academic Press.
- Feng, T., Sun, M., Song, S., Zhuang, H., & Yao, L. (2019). Gas chromatography for food quality evaluation. In J. Zhong, & X. Wang, *Evaluation Technologies for Food Quality* (pp. 219-265). Evaluation Technologies for Food Quality Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition.
- Fernández, A., García, C., Saéz, J., & Valdezate, S. (2010). *Metodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología*. Retrieved from Repositorio de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC): <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>
- Forgács, E., & Cserháti, T. (2003). Gas chromatography. In M. Lees, *Food Authenticity and Traceability Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition* (pp. 197-217. doi: 10.1533/9781855737181.1.197). Sawston: Woodhead Publishing.
- Fossum, K., Herikstad, H., Binde, M., & Pettersen, K. (1986). Isolation of *Bacillus subtilis* in connection with bovine mastitis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 38(4), 233-236. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3095788>.

- Gorewit, R., Wachs, E., Sagi, R., & Merrill, W. (1986). Current Concepts on the Role of Oxytocin in Milk Ejection. *Journal of Dairy Science*, 66(10), 2236-2250.  
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(83\)82073-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)82073-6).
- Guillen, A. (2020, October 12). *Morfología colonial*. Retrieved from Microbiología: Ensayos de microbiología clínica: <https://dingmicrolab.wordpress.com/2020/10/12/morfologia-colonial/>
- Górska, H., Rejman, K., Laskowski, W., & Czeczotko, M. (2019). Milk and Dairy Products and Their Nutritional Contribution to the Average Polish Diet. *Nutrients*, 11(8), 1-19.
- Haxhijaj, K., Wishart, D., & Ametaj, B. (2022). Mastitis: What It Is, Current Diagnostics, and the Potential of Metabolomics to Identify New Predictive Biomarkers. *Dairy*, 3(4), 722-746. <https://doi.org/10.3390/dairy3040050>.
- Hinshaw, J. (2015). *The Flame Ionization Detector*. Retrieved from Chromatography Online. : <https://www.chromatographyonline.com/view/flame-ionization-detector>
- Hunt, K. M., Williams, J. E., Shafii, B., Hunt, M. K., Behre, R., Ting, R. C., . . . McGuire, M. A. (2013). Mastitis is associated with increased free fatty acids, somatic cell count, and interleukin-8 concentrations in human milk. *Breastfeeding Medicine*, 8(1), 105-110.  
<https://doi.org/10.1089/bfm.2011.0141>.
- Idda, I., Spano, N., Ciulu, M., Nurchi, V., Panzanelli, A., Pilo, M., & Sanna, G. (2016). Gas chromatography analysis of major free mono- and disaccharides in milk: Method assessment, validation, and application to real samples. *Journal of Separation Science*, 39(23), 4577-4584. <https://doi.org/10.1002/jssc.201600583>.
- Instituto Nacional de Estadística y Censos. (2021). *Boletín Técnico Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua, 2020*. Quito: INEC.
- Khan, M. Z., Huang, B., Kou, X., Chen, Y., Liang, H., Ullah, Q., . . . Wang, C. (2024). Enhancing bovine immune, antioxidant and anti-inflammatory responses with vitamins, rumen-protected amino acids, and trace minerals to prevent periparturient mastitis. *Frontiers in Immunology*, 14, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1290044>.

- Laboratorios Industriales Farmacéuticos Ecuatoriano (LIFE). (2022, February ). *Ficha técnica del CMT*. Retrieved from LIFE: <https://www.life.com.ec/wp-content/uploads/2022/02/CMT.pdf>
- Leininger, D. J., Roberson, J. R., & Elvinger, F. (2001). Use of Eosin Methylene Blue Agar to Differentiate Escherichia Coli from Other Gram-Negative Mastitis Pathogens. *Journal Of Veterinary Diagnostic Investigation*, 13(3), 273-275.  
10.1177/104063870101300319.
- Leitner, G., Krifucks, O., Merin, U., Lavi, Y., & Silanikove, N. (2006). Interactions between bacteria type, proteolysis of casein and physico-chemical properties of bovine milk. *International Dairy Journal*, 16(6).
- MacFaddin, J. (2000). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica (3. ed). *Ed. Médica Panamericana*.
- Martins, S., Martins, V., Cardoso, F., Germano, J., Rodrigues, M., Duarte, C., . . . Freitas, P. (2019). Biosensors for On-Farm Diagnosis of Mastitis. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 1-19.
- Mohan, S., Rohit, M., Subhash, G., Chandra, R., Devi, M., Butti, S., & Rajesh, K. (2019). Chapter 12 - Algal oils as biodiesel. In A. Pandey, J. Chang, R. Soccol, D. Lee, & Y. Chisti, *Biofuels from Algae* (pp. 287-323). Toluca: Elsevier.
- Moneeb, A., Hammam, A., Ahmed, A., Ahmed, M., & Alsaleem, K. (2021). Effect of fat extraction methods on the fatty acids composition of bovine milk using gas chromatography. *Food Science and Nutrition*, 9(6), 2936-2942.  
<https://doi.org/10.1002/fsn3.2252> .
- Morales, A., Rivero, N., Valladares, B., Velázquez, V., Delgadillo, L., & Zaragoza, A. (2023). Bovine mastitis, a Worldwide impact Disease: Prevalence, antimicrobial resistance, and viable alternative approach. *Veterinary and Animal Science*, 21,  
<https://doi.org/10.1016/j.vas.2023.100306>.
- Moran, J. (2015, May 18). *Managing Cow Lactation Cycles*. Retrieved from The Cattle Site: <https://www.thecattlesite.com/articles/4248/managing-cow-lactation-cycles/>

- National Academy of Sciences. (1988). *Designing Foods: Animal Product Options in the Marketplace*. Washington (DC): National Academies Press (US).
- Nichols, S. (2021). Chronic Udder Abscess. In J. Orsini, N. Grenager, & A. De Lahunta, *Comparative Veterinary Anatomy A Clinical Approach* (pp. 1236-1241. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91015-6.00113-8>). Academic Press.
- Nickerson, S., & Akers, R. (2011). Mammary Gland. In J. Fuquay, P. Fox, & P. McSweeney, *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Vol. 3, pp. 328-337. 10.1016/B978-0-12-374407-4.00290-9). San Diego: Academic Press.
- Nikolopoulou, K. (2022, July 20). *What Is Non-Probability Sampling? | Types & Examples* . Retrieved from Scribbr: <https://www.scribbr.com/methodology/non-probability-sampling/>
- Oliver, S., & Sordillo, M. (1988). Udder Health in the Periparturient Period. *Journal of Dairy Science*, 71(9), 2584-2606. 10.3168/jds.S0022-0302(88)79847-1.
- Ortega, C. (2021). *Muestreo no probabilístico: definición, tipos y ejemplos*. Retrieved from QuestionPro: <https://www.questionpro.com/blog/es/muestreo-no-probabilistico/>
- Park, Y., Koo, H., Kim, S., Hwang, S., Jung, W., Kim, J., . . . Park, T. (2007). The Analysis of Milk Components and Pathogenic Bacteria Isolated from Bovine Raw Milk in Korea. *Journal of Dairy Science*, 90(12), 5405-541.
- Pereira, P., & Vicente, F. (2017). Chapter 13 - Milk Nutritive Role and Potential Benefits in Human Health. In R. Watson, R. Collier, & V. Preedy, *Nutrients in Dairy and Their Implications for Health and Disease* (pp. 161-176. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809762-5.00013-9>). Cambridge: Academic Press.
- Pumipuntu, N., Kulpeanprasit, S., Santajit, S., Tunyong, W., Kong-Ngoen, T., Hinthong, W., & Indrawattana, N. (2017). Screening method for *Staphylococcus aureus* identification in subclinical bovine mastitis from dairy farms. *Veterinary World*, 10(7), 721-726. 10.14202/vetworld.2017.721-726.
- Rai, S., Yadav, U. N., Pant, N. D., Yakha, J. K., Tripathi, P. P., Poudel, A., & Lekhak, B. (2017). Bacteriological Profile and Antimicrobial Susceptibility Patterns of Bacteria

- Isolated from Pus/Wound Swab Samples from Children Attending a Tertiary Care Hospital in Kathmandu, Nepal. . *International Journal Of Microbiology*, 1-5.  
<https://doi.org/10.1155/2017/2529085>.
- Ramírez, S. (2016, Febrero 28). *La industria produce más y vende menos*. Retrieved from Revista Líderes: <https://www.revistalideres.ec/lideres/crecimiento-produccion-disminucion-ventas-ecuador.html>
- Romanzin, A., Corazzin, M., Piasentier, E., & Bovolenta, S. (2013). Effect of rearing system (mountain pasture vs. indoor) of Simmental cows on milk composition and Montasio cheese characteristics. *Journal of Dairy Research*, 80(4), 390–399.  
<https://doi.org/10.1017/s0022029913000344>.
- Sanz, M. (2021, 04 May). *SHEEP AND GOAT UDDER BASICS: How does it work?*  
Retrieved November 2023, from About small ruminants:  
<https://aboutsmallruminants.com/sheep-goat-udder-basics-anatomy-physiology/>
- Sasikala, C., & Ramana, C. (1998). Biodegradation and metabolism of unusual carbon compounds by anoxygenic phototrophic bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 339-377. [https://doi.org/10.1016/s0065-2911\(08\)60020-x](https://doi.org/10.1016/s0065-2911(08)60020-x).
- Schadt, I. (2023). Health concerns about possible long-term effects of legally marketed milk and dairy from animals with intramammary infections. *Frontiers in Public Health*, 11, <https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.1200924>.
- Schauer, B., Wald, R., Urbantke, V., Loncaric, I., & Baumgartner, M. (2021). Tracing Mastitis Pathogens—Epidemiological Investigations of a *Pseudomonas aeruginosa* Mastitis Outbreak in an Austrian Dairy Herd. *Animals*, 11(2), 279.  
<https://doi.org/10.3390/ani11020279>.
- Sharma, N., & Jeong, D. (2013). Stem Cell Research: A Novel Boulevard towards Improved Bovine Mastitis Management. *International Journal of Biological Sciences*, 9(8), 818–829.
- Sigma-Aldrich Co. LLC. (2023). *GC Analysis of a 37-Component FAME Mix on SPTM-2560, Slower Oven Ramp*. Retrieved from Merck.:

<https://www.sigmaaldrich.com/EC/es/technical-documents/protocol/analytical-chemistry/gas-chromatography/gc-analysis-of-component-fame>

Sood, S., Singhal, R., Bhat, S., & Kumar, A. (2019). Inoculum Preparation. In M. Moo-Young, *Comprehensive Biotechnology (Third Edition)* (Vol. 2, pp. 230-243).

<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00076-8>. Elsevier.

Stauffer, E., Dolan, J., & Newman, R. (2008). Gas Chromatography and Gas Chromatography—Mass Spectrometry. In E. Stauffer, J. Dolan, & R. Newman, *Fire Debris Analysis* (pp. 235-293). Academic Press.

Steward, K. (2023, December 18). *Gram Positive vs Gram Negative*. Retrieved from Technology Networks: Immunology & Microbiology:

<https://www.technologynetworks.com/immunology/articles/gram-positive-vs-gram-negative-323007>

Suge, T., Magu, D., & Wanzala, P. (2023). Correlation between Escherichia coli resistant gene isolated from stool samples of children under five years and that from consumed water. *Scientific African*, 22, e01937.

<https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2023.e0193>.

Tebbey, P. W., & Buttke, T. M. (1990). Molecular basis for the immunosuppressive action of stearic acid on T cells. *Immunology*, 70(3), 379-384.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2379942>.

Terán, J. (2019). *Análisis del mercado de la leche en Ecuador: factores determinantes y desafíos*. Retrieved from [Tesis de maestría]. Universidad Politécnica de València.

Repositorio de la UPV:

<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/124490/Ter%C3%A1n%20-%20An%C3%A1lisis%20del%20mercado%20de%20la%20leche%20en%20Ecuador%3A%20factores%20determinantes%20y%20desaf%C3%ADos.pdf>

Tetra Pak. (2012). *CHAPTER 1 PRIMARY PRODUCTION OF MILK*. Retrieved from Dairy Processing Handbook:

<https://dairyprocessinghandbook.tetrapak.com/chapter/primary-production-milk>

- Tizard, I. (2009). *Introducción a la inmunología veterinaria (8.a ed.)*. Elsevier.
- Wollowski, L., Bertulat, S., Kossatz, A., & Heuwieser, W. (2019). Short communication: Diagnosis and classification of clinical and subclinical mastitis utilizing a dynamometer and a handheld infrared thermometer. *Journal Of Dairy Science*, *102*(7), 6532-6539. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15509>.
- Xu, E., Chen, C., Fu, J., Zhu, L., Shu, J., Jin, M., . . . Zong, X. (2021). Dietary fatty acids in gut health: absorption, metabolism and function. *Animal Nutrition*, *7*(4), 1337-1344. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.09.010>.
- York, M. K., Baron, E. J., Clarridge, J. E., Thomson, R. B., & Weinstein, M. P. (2000). Multilaboratory Validation of Rapid Spot Tests for Identification of *Escherichia coli*. *Journal Of Clinical Microbiology*, *38*(9), 3394-3398. <https://doi.org/10.1128/jcm>.
- Zhou, X., & Li, Y. (2015). Chapter 2 - Techniques for Oral Microbiology . In X. Zhou, & Y. Li, *Atlas of Oral Microbiology From Healthy Microflora to Disease* (pp. 15-40. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802234-4.00002-1>). Chengdu: Academic Press.