

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS - ESPE

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE LA LECHE
MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO, PROVENIENTE DE
BOVINOS DE LA PARROQUIA MACHACHI, PROVINCIA
DE PICHINCHA.**

Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

PATRICIA ALISON MERA RUIZ.

SANGOLQUÍ, 15 de Octubre del 2013

CERTIFICACIÓN

María Augusta Chávez MVZ., M.Sc.

Ing. Verónica Marcillo

Certifican:

Que el trabajo titulado Evaluación de la calidad de la leche mediante citometría de flujo, proveniente de bovinos de la parroquia Machachi, provincia de Pichincha, realizado por Patricia Alison Mera Ruiz, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

Debido a que pese que es un trabajo preliminar presenta información importante por lo que SI recomiendan su publicación.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de pdf. Autorizan a Patricia Alison Mera Ruiz que lo entregue a María Augusta Chávez MVZ M.Sc., en su calidad de Coordinador de la Carrera.

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. PATRICIA ALISON MERA RUIZ como requerimiento parcial a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Sangolquí, 15 de Octubre del 2013

María Augusta Chávez MVZ, M.Sc.

DIRECTOR

Ing. Verónica Marcillo

CODIRECTOR

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Patricia Alison Mera Ruiz

Declaro que:

El proyecto de grado denominado Evaluación de la calidad de la leche mediante citometría de flujo, proveniente de bovinos de la parroquia Machachi, provincia de Pichincha, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, 15 de Octubre del 2013

Patricia Alison Mera Ruiz

AUTORIZACIÓN

Yo, Patricia Alison Mera Ruiz

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo Evaluación de la citometría de flujo, proveniente de bovinos de la parroquia Machachi, provincia de Pichincha, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 15 de Octubre del 2013.

Patricia Alison Mera Ruiz

DEDICATORIA

A mis padres, quienes han formado la persona que soy, que con su ejemplo de perseverancia y constancia han velado por mi bienestar y educación siendo un gran apoyo.

A mis hermanos, Erika e Isaac, quienes me han acompañado a lo largo de mi vida, y han formado parte de muchos aciertos y errores.

A mi novio Gustavo, quien ha sido mi fortaleza y mi más fiel compañero, la persona que ha sabido apoyarme para continuar y nunca renunciar.

A todos ustedes, les dedico todo el esfuerzo y trabajo puesto para la realización de esta tesis.

“La dicha de la vida consiste en tener siempre algo que hacer, alguien a quien amar y algo que esperar”. Thomas Chalmer

Patricia Alison Mera Ruiz.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente a Dios, por ser mi mayor sustento día a día y por permitirme llegar hasta aquí.

A Gustavo, quien representó una parte fundamental en la elaboración y culminación de esta tesis. A mi madre y mi hermana, gracias por su gran esfuerzo.

A mis maestros a quienes debo gran parte de mis conocimientos, gracias a su paciencia y enseñanza.

A todos aquellos que me ayudaron directa o indirectamente, a quienes me abrieron las puertas para la elaboración de este proyecto, la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro, el Centro Internacional de Zoonosis y finalmente los propietarios de cada una de las fincas visitadas.

Patricia Alison Mera Ruiz.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	VI
CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
1.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	1
1.2 JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA	2
1.3 OBJETIVOS	4
1.4 MARCO TEÓRICO	4
1.4.1 Introducción	4
1.4.2 Historia.....	5
1.4.3 Leche y productos lácteos	7
1.4.4 Calidad de la leche	12
1.4.4.1 Parámetros de calidad	14
1.4.4.2 Principales problemas con la calidad de la leche	17
Parámetros físico-químicos de la leche.....	17
Células somáticas (SCC).....	18
Contaminación bacteriana.....	21
Mastitis.....	21
Mastitis y la influencia en la calidad de la leche.....	23
Agentes causantes de la mastitis	24
Control de la mastitis	26
Tratamiento de la mastitis	28
Brucelosis.....	29
Control de la brucelosis.....	32
Tratamiento de la brucelosis	32
1.4.5 Análisis de lácteos.....	33
Citometría de flujo	33
Otras metodologías	34
1.5 HIPÓTESIS	35
CAPITULO 2: MATERIALES Y METODOS	36
2.1 DISEÑO DEL ESTUDIO	36
2.2 PARTICIPANTES	36
2.2.1 Personas	36
2.3 ZONA DE ESTUDIO	37
2.3.1 Descripción de la zona de estudio.....	37
2.4 PERÍODO DE TIEMPO DE INVESTIGACIÓN.....	38
2.5 DISEÑO ESTADÍSTICO	38
2.5.1 Análisis Descriptivo de las variables	39
2.5.2 Análisis Descriptivo	40
2.5.3 Análisis de Asociación entre variables	41
2.5.4 Análisis de correspondencia múltiple	41
2.5.5 Prevalencia	42
2.5.6 Análisis de Factores Determinantes	42
2.6 PROCEDIMIENTOS.....	43

2.6.1 Trabajo de campo.....	43
2.6.1.1 Muestreo.....	43
2.6.2 Trabajo de Laboratorio.....	43
2.6.2.1 Conteo de células somáticas	44
2.6.2.2 Conteo bacteriano	45
2.6.2.3 Parámetros físico-químicos.....	46
2.6.2.4 Milk Ring Test (MRT).....	47
2.6.2.5 Cultivo específico de Brucella spp.	48
2.6.2.6 Identificación Bacteriana mediante Medios de Cultivo específicos para el diagnóstico de Gram (-)	49
CAPITULO 3: RESULTADOS	52
3.1 DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA MUESTRA.....	52
3.2 ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LAS VARIABLES	53
3.3 RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS DE LABORATORIO.....	54
Descripción general de los resultados	54
Análisis descriptivo de los resultados	56
Análisis de Asociación entre Variables	57
Análisis de Correspondencia Múltiple	66
Prevalencia de Brucelosis	66
Análisis de Factores determinantes para la calidad de la leche.	67
CAPITULO 4: DISCUSIÓN	69
4.1 CÉLULAS SOMÁTICAS.....	69
4.2 GRASA	71
4.3 PROTEÍNA	72
4.4 SÓLIDOS TOTALES	72
4.5 SÓLIDOS NO GRASOS	74
4.6 BACTERIAS	75
4.7 ANÁLISIS DE LAS VARIABLES	76
4.8 TANQUES DE ENFRIAMIENTO.....	77
4.9 PREVALENCIA DE BRUCELOSIS	78
CAPITULO 5: CONCLUSIONES	80
CAPITULO 6: RECOMENDACIONES	81
CAPITULO 7: BIBLIOGRAFÍA	82

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1.- Requisitos físico-químicos y bacteriológicos de la leche a nivel mundial. Componentes standard según las organizaciones que rigen en cada país.	16
Tabla 1.2.- Requisitos específicos físico-químicos y microbiológicos de la leche cruda. ...	16
Tabla 3.1.- Descripción de la muestra y categorización de los datos, Machachi-Ecuador 2013.	52
Tabla 3.2.- Resultados de los análisis descriptivos de las variables, de los datos tomados del ganado lechero bovino en Machachi-Ecuador 2013.	53
Tabla 3.3.- Descripción y categorización de los resultados de laboratorio, Machachi-Ecuador 2013.	54
Tabla 3.4.- Descripción general según la categorización de las muestras de los tanques de enfriamiento tomados en las haciendas de Machachi-Ecuador 2013.	55
Tabla 3.5.- Análisis descriptivo de los resultados de las muestras tomadas en Machachi-Ecuador 2013.	56
Tabla 3.6.- Resultados de las asociaciones estadísticamente significativas entre células somáticas y las diferentes variables, Machachi-Ecuador 2013.	57
Tabla 3.7.- Resultados de las asociaciones estadísticamente significativas entre el parámetro grasa y las diferentes variables, Machachi-Ecuador 2013.	60
Tabla 3.8.- Resultados de las asociaciones estadísticamente significativas entre el parámetro proteína y las diferentes variables, Machachi-Ecuador 2013.	61
Tabla 3.9.- Resultados de las asociaciones estadísticamente significativas entre el parámetro sólidos totales y las diferentes variables, Machachi-Ecuador 2013.	62
Tabla 3.10.- Resultados de las asociaciones estadísticamente significativas entre el parámetro sólidos no grasos y las diferentes variables, Machachi-Ecuador 2013.	64
Tabla 3.11.- Resultados de las asociaciones estadísticamente significativas entre el parámetro bacterias y las diferentes variables, Machachi-Ecuador 2013.	65
Tabla 3.12.- Resultados del análisis de los factores de riesgo de las haciendas de Machachi-Ecuador 2013.	67

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1.- Producción mundial de leche de vaca, entera y fresca, año 2011. Los diez mayores productores en toneladas métricas de leche (MT) y dólares internacionales (Int \$) de producción. <i>Fuente:</i> (FAOSTAT, 2013a).	8
Figura 1.2.- Índice de la FAO para los precios internacionales de los productos lácteos, 2002-2004. Fluctuación de los precios a través de los años hasta el período 2012. <i>Fuente:</i> (FAO-SMIA, 2012).	9
Figura 1.3.- Mayor Producción – Ecuador-2011. Principales productos que se comercializan en el país para producción en dólar internacional y toneladas métricas. <i>Fuente:</i> (FAOSTAT, 2013b).	10
Figura 1.4.- Participación Cantonal. Porcentaje que cubre cada cantón en el Ecuador en cuanto a las Unidades Productoras Agropecuarias. <i>Fuente:</i> (III Censo Nacional Agropecuario, 2000).	11
Figura 1.5.- Producción de leche. Litros de leche producidos por cada cantón de la región Sierra. <i>Fuente:</i> (III Censo Nacional Agropecuario, 2000).	12
Figura 2.1.- Mapa de la Zona de estudio.	37
Figura 3.1.- Gráfico de correspondencia múltiple entre las variables de las muestras de las haciendas de Machachi-Ecuador 2013.	66

NOMENCLATURA

BCS: siglas en inglés de Body Condition Score.

BRT: siglas en inglés de Brucellosis Ring Test.

CFSPH: siglas en inglés de Center for Food Security and Public Health.

CIL: Centro de la Industria Lechera.

CIZ: Centro Internacional de Zoonosis.

CMT: siglas en inglés de California Mastitis Test.

FAO/OMS: siglas en inglés de Food and Agriculture Organization of the United Nations/Organización Mundial de la Salud.

FAO: siglas en inglés de Food and Agriculture Organization.

FAO-SMIA: Sistema Mundial de Información y Alerta de la Organización de las Naciones Unidas.

FAOSTAT: siglas en inglés de Food and Agriculture Organization Statistics.

FTIR: siglas en inglés de Fourier transform infrared spectroscopy.

IBC: siglas en inglés de Individual Bacteria Count.

Ig: Inmunoglobulina.

IMI: Infección intramamaria.

INEC: Instituto Nacional de Estadísticas y Censos.

INEN: Instituto Ecuatoriano de Normalización.

INFOODS: siglas en inglés de International Network of Food Data Systems.

MAG-SESA: Ministerio de Agricultura y Ganadería-Servicio Ecuatoriano de Sanidad Agropecuaria (Agrocalidad).

MRT: siglas en inglés de Milk Ring Test.

NAHMS: siglas en inglés de National Animal Health Monitoring System.

NAL: siglas en inglés de Nutrient Data Laboratory.

NIR: siglas en inglés de Near-infrared spectroscopy.

OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal.

OMC: Organización Mundial del Comercio.

PMN: Leucocitos Polimorfonucleares

SCC: siglas en inglés de Somatic Cell Count.

SEM: Secretaría Económica Mexicana.

SIPAE: Sistema de la Investigación de la Problemática Agraria del Ecuador.

SNF: Sólidos no grasos.

ST: Sólidos Totales.

TBC: siglas en inglés de Total Bacteria Count.

UFC: Unidades Formadoras de Colonia.

UPA: Unidad de Producción Agropecuario.

USDA: siglas en inglés de United States Department of Agriculture.

RESUMEN

Los índices de calidad de la leche han sido de fundamental importancia, porque tiene relación directa con la salud de los seres humanos y el estado económico de los países. Sin embargo debido a las políticas de producción y consumo en el Ecuador es necesario mejorar la sanidad agropecuaria y el control de los alimentos a través de la verificación y regulación de los parámetros de calidad. En el presente estudio se analizó la calidad de la leche con muestras de haciendas ubicadas en la parroquia Machachi, pertenecientes a 409 bovinos y 12 tanques de enfriamiento. Se determinó el conteo de células somáticas con el Fossomatic FC; grasa, proteína, sólidos totales y sólidos no grasos con el Milkoscan FT+, bacterias con el Bactoscan FC, la prevalencia de *Brucella spp.*, mediante MRT y la confirmación en medio específico Farrell y tipificación de bacterias Gram negativas. De todas las muestras estudiadas el 87.04% SCC, 15.16% grasa, 90.22% proteína, 21.76% ST, 77.75% SNF y 98.77% bacterias se encontraron dentro de la Norma Ecuatoriana INEN en cada uno de los parámetros indicados, mientras que en las muestras de los tanques de enfriamiento se encontró que el 83.34% SCC, 83.33% grasa, 91.67% proteína, ST, SNF y 100% bacterias. La PA de *Brucella spp.*, fue del 16.62% (67/403), pero debido a las reacciones cruzadas sólo se pudo aislar *E. coli* y *P. vulgaris*. Al analizar los factores de riesgo las variables que presentaron asociaciones estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para a) SCC: edad de los bovinos, partos, suplemento y tamaño de la hacienda; b) grasa: producción, suplemento y tamaño de la hacienda; c) proteína: la etapa de lactancia; d) ST: la presencia de abortos, producción, suplemento y tamaño de la hacienda; e) SNF: la edad y partos, y finalmente f) bacterias: el suplemento y tamaño de la hacienda.

Palabras clave: conteo de células somáticas, citometría de flujo, *Brucella spp.*, MRT.

ABSTRACT

Rates of milk quality have been of fundamental importance because it has direct relation on the health of humans and the economic conditions of the countries. However, due to the production and consumption policies in Ecuador is necessary to improve livestock health and food control with the verification and regulation of the quality parameters of the different aliments. In the present study we analyzed the quality of the milk samples estates in the parish Machachi, belonging to 409 cattle and 12 bulk tank milk. We determined with Fossomatic FC equipment: the somatic cell count; with Milkoscan FT+ machine: fat, protein, total solids and solids not fat; with Bactoscan FC: bacteria's concentration; and the prevalence of *Brucella* spp. by MRT with the confirmation in Farrell specific medium and biochemical typing of Gram-negative bacteria. Of all the samples studied the 87.04% SCC, 15.16% fat, 90.22% protein, 21.76% ST, 77.75% SNF and 98.77% bacteria were found in the parameters of the Standard INEN in each parameters indicated, while the samples bulk tank milk found that 83.34% SCC, 83.33% fat, 91.67% protein, ST, SNF and 100% bacteria were into the reporting. The PA of *Brucella* spp. was 16.62% (67/403), but due to cross-reactions only *E. coli* and *P. vulgaris* were could be isolated. The risk factors analysis demonstrate variables' associations with statistically significant ($p < 0.05$) for a) SCC: age of cattle, calving, supplement and farm size; b) fat: production, supplement and farm size; c) protein: the stage of lactation, d) ST: the presence of abortions, production, supplement and farm size; e) SNF: age and parity, and finally f) bacteria: the supplement and farm size.

Keywords: somatic cell count, flow citometry, *Brucella* spp., MRT.

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE LA LECHE MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO, PROVENIENTE DE BOVINOS DE LA PARROQUIA MACHACHI, PROVINCIA DE PICHINCHA

1.1 Formulación del problema

Los índices de calidad de los productos como la leche han sido de fundamental importancia a lo largo de los últimos años, puesto que tiene una relación directa con la salud de los seres humanos y el estado económico de las regiones, es así que en 1991, National NAHMS llevó a cabo el Proyecto de Evaluación Nacional de Lechería en Novillos, cuya línea base presentó estimaciones de prevalencia de *Cryptosporidium*, *Escherichia coli* cepa O157: H7 y *Salmonella* (USDA, 2007).

Por otra parte en 1992, la Unión Europea emitió la Directiva 92/46, que estableció los requisitos de higiene para la producción de leche cruda, preparación de subproductos y comercialización, además debido al incremento de la virulencia y resistencia de algunos microorganismos y tomando en cuenta el incremento de casos de enfermedades transmitidas por alimentos, se estableció la necesidad de analizar por primera vez bacterias presentes en lácteos, encontrándose en algunos países en vías de desarrollo informes sobre la presencia de organismos nocivos entre un 10-20% de las muestras, tales como *E.coli* cepa: O157: H7, *Brucella melitensis*, *Staphylococcus aureus*, entre otros; marcando el inicio del desarrollo de estudios en alimentos, tras la implementación de algunas políticas alimentarias (Giangiacomo, 2000).

Dairy NAHMS, (2002) describió las estrategias de gestión para prevenir y reducir la enfermedad de Johne y determinar factores de manejo asociados con *Mycoplasma* y *Listeria* en leche de tanque; finalmente el mismo organismo en un cuarto estudio del ganado lechero en USA, se centró en el confort de la vaca, salud de los terneros no destetados, diarrea viral bovina, mastitis contagiosa por patógenos, y nivel de prevalencia de *M. paratuberculosis* en hatos, con resultados de tres enfermedades con prevalencias de 16.5, 14 y 12.9% de vacas lecheras con mastitis clínica, cojera, y problemas de infertilidad, respectivamente; reportado por los productores en el 2006 (USDA, 2007).

Por los antecedentes mencionados, y debido a las políticas de producción y consumo de ciertos sectores, en el Ecuador se ve la necesidad de mejorar a corto y mediano plazo la sanidad agropecuaria y el control de los alimentos, así la globalización de la economía y la creación de la Organización Mundial de Comercio, a través de la aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias, exige al continente Americano y el Caribe cumplir con normas internacionales para impedir la difusión de enfermedades animales, plagas vegetales y contaminación de los alimentos; obligando a la adopción de prácticas sanitarias adecuadas, apoyadas en servicios de sanidad agropecuaria y de control de alimentos modernos y eficientes (FAO/OMS, 2005).

Aunque en el Ecuador la información sobre la calidad de la leche resulta escasa, en el 2008 se realizó una de las primeras intervenciones mediante estudios realizados en los laboratorios de la Universidad Politécnica Salesiana, que dio paso al inicio de un proyecto pecuario en el cantón Cayambe, provincia de Pichincha; permitiendo implementar un servicio para el control de la calidad de la leche, desarrollar proyectos de apoyo técnico a los ganaderos, elaborar bases de datos pecuarios de las fincas y desarrollar políticas de capacitación en áreas gerenciales relacionadas con la ganadería (Contero, 2008).

Recalcando la necesidad de continuar con estudios o proyectos pecuarios en el resto de zonas lecheras del país, ya que se está en etapas preliminares para el establecimiento de un laboratorio de referencia nacional en la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la calidad del Agro, misma que busca ser el organismo por medio del cual se determine la calidad de la leche para consumo interno y con perspectivas de exportación.

1.2 Justificación del problema

La industria lechera es uno de los sectores más importantes, especialmente al generar empleo a nivel agropecuario y tener impacto en la economía del Ecuador y en los países de la región Andina; los productores de esta zona garantizan el abastecimiento interno y contribuyen fundamentalmente a la seguridad y soberanía alimentaria, siendo la leche el único producto tradicional que ha dado un ingreso relativamente constante y creciente en los últimos

años a los pequeños productores (SIPAE, 2007) que junto a sus derivados, se encuentran presentes en la dieta de los ecuatorianos.

Por lo que es necesario obtener productos altamente nutritivos y de calidad incuestionable, a través de la verificación y regulación de los parámetros de calidad que son de vital importancia, pues para el consumidor esto significa salud y seguridad, mientras que en el sector ganadero implica mejoras en la producción al tener un hato sano y por lo tanto mayores ingresos (Cabral & Aguilar, 2002).

La calidad de la leche implica analizar cantidad, componentes y factores contaminantes como bacteriológicos, presencia de residuos y células somáticas (Rivas *et al.*, 2001), siendo este último, uno de los parámetros de calificación de la leche cruda (Jánosi & Baltay, 2004) y un medio para juzgar el estado de salud de las ubres en animales de producción de los hatos ganaderos, por ser considerado un indicador de mastitis bovina (Rivas *et al.*, 2001), en base a que refleja la respuesta inmune y la presencia de infección (Barkema *et al.*, 2009), lo que puede perjudicar la producción y dañar las características de los lácteos (Rivas *et al.*, 2001), pudiéndose prevenir manteniendo el bienestar de los animales y el control de enfermedades (Hernández & Bedolla, 2008).

La citometría de flujo es una metodología que por su seguridad y velocidad permite la cuantificación de un gran número de células, produciendo mayor exactitud en los resultados y precisión en la identificación (Rivas *et al.*, 2001), es una alternativa para un mayor control en cuanto a células somáticas y bacterianas en leche, por sus ventajas frente a métodos tradicionales como la citología convencional (Jánosi & Baltay, 2004), en cuanto a su rapidez de operación como también la identificación de células viables de las no viables (Rivas *et al.*, 2001).

La brucelosis es una enfermedad de significancia social y de distribución mundial, porque representa un gran riesgo debido a su naturaleza zoonótica con severas consecuencias (Xavier *et al.*, 2009; Aznar *et al.*, 2012), es importante el estudio de la prevalencia a nivel de fincas, pues representa una amenaza tanto para las personas y los animales como para la producción, ya que las bacterias se las puede encontrar en algunos fluidos como la leche

(D'pool & Díaz, 2005), por lo que es indispensable tanto para el consumo interno como para proyecciones de exportación que el producto cumpla con normas en las cuales se establece ser libre de brucelosis (INEN, 2012; Robert, 2007).

Lo que permite destacar la necesidad de probar un método diagnóstico en leche como Milk Ring Test, de bajo costo, rápido y eficiente, que identifique la presencia de *Brucella* spp. mediante la determinación de anticuerpos específicos, permitiendo relacionar los resultados con el cultivo in-vitro, facilitando así un tamizaje de muestras y una mejor valoración de técnicas.

1.3 Objetivos

Objetivo general

Evaluar la calidad de la leche mediante citometría de flujo, proveniente de bovinos de la parroquia Machachi, Provincia de Pichincha.

Objetivos Específicos

- Evaluar la calidad de la leche recolectada por animal y en tanque de enfriamiento a través de la determinación de parámetros como: número de células somáticas, concentración bacteriana, grasa, proteína total, sólidos totales y sólidos no grasos.
- Estimar la prevalencia de *Brucella* spp. mediante la técnica de Milk Ring Test y relacionar los resultados con el cultivo microbiano.
- Evaluar los posibles factores de riesgo que influyen en la calidad de la leche mediante la aplicación de encuestas epidemiológicas.

1.4 Marco Teórico

1.4.1 Introducción

Actualmente, la producción láctea se incrementa de manera sostenida, como consecuencia de un mejoramiento sanitario, genético, manejo y alimentación de los

establecimientos, generando así ganancias relativamente rápidas a los pequeños productores pecuarios, los cuales proveen casi la totalidad de la leche a los países en desarrollo, donde se prevé un incremento de la demanda equivalente al 25% para 2025 y donde el 80% de la leche que se consume (200 000 millones L/año), se comercializa fuera del mercado organizado y no está sujeta a la debida reglamentación (FAO, 2012).

Ya que éste producto es un alimento equilibrado y un elemento clave de la seguridad alimentaria del hogar, mantener su calidad es fundamental, pues mejora la economía, salud humana y tiempo de duración del lácteo, para lo cual es necesario mantener la salud del animal, limpieza del lugar, enfriamiento del producto y su rápida comercialización, tomando en cuenta aquellos factores que alteran su estabilidad y características como el número de bacterias, salud de las vacas, calidad y pureza del alimento (O'Grady & Doherty, 2011).

1.4.2 Historia

Las reformas en las políticas agrícolas, así como las negociaciones comerciales internacionales tienen un alto impacto en el comercio de lácteos, debido a que se trata de un sector que mantiene una política de proteccionismo, especialmente en los países industrializados, que concentran actualmente la mayor parte de la demanda, importaciones y exportaciones mundiales, basados en subsidios como la Unión Europea (SEM, 2012).

Es así que las políticas de calidad a largo plazo han permitido ir mejorando los sistemas de producción y las características finales del producto, pero todo ha tenido un avance progresivo, así en 1996 el objetivo fue reducir la prevalencia mundial de mastitis bovina en la industria láctea, para lo cual muchos países prohibieron que salga a la venta leche que contenga $SCC > 500\ 000$ cel./mL o se acerquen a dicha cifra (Rivas *et al.*, 2001).

En la última década, se ha puesto mayor énfasis a nivel mundial en las enfermedades transmitidas por alimentos; así la OMS y la FAO se involucran en el desarrollo de programas encaminados a vigilar estas enfermedades y minimizar sus efectos; además la Unión Europea emite disposiciones relativas a la higiene en la producción, recolección y procesamiento de leche, como que los animales deben oficialmente encontrarse libres de tuberculosis y

brucelosis, el producto no debe tener sustancias residuales como medicamentos o detergentes y se establece el límite máximo total bacteriano (Giangiacomo, 2000).

Entre el 2003-2004, el sector lechero ha recibido mayor influencia de las políticas gubernamentales pero no en todos los países, siendo las principales (i) bajos precios internacionales de los productos lácteos, (ii) introducción de políticas para mejorar las normas de calidad en la granja, orientadas a elevar la calidad de la higiene de la leche (iii) ajustes en las políticas nacionales para armonizarlas con la política agrícola común, y (iiii) algunos países, como Brasil y Venezuela, introdujeron medidas para limitar las importaciones de lácteos de otros países miembros de Mercosur y Pacto Andino (FAO, 2005).

Actualmente un gran número de países en el mundo considera la producción y abasto de leche como una prioridad nacional, razón por la cual establecen políticas de alto proteccionismo para el sector lácteo (SEM, 2012).

En los últimos años el Ecuador posee para el control de alimentos que se producen y comercializan, una Ley de Control de Precios y Calidad, la cual faculta al Instituto Ecuatoriano de Normalización INEN, realizar y coordinar todas las acciones en materia de normalización y supervisión de las normas técnicas con carácter obligatorio de dichos productos; además otros instrumentos legales para el mismo objetivo están dispersos en los Ministerios de Agricultura, Industrias, Comercio y Pesca y de Salud Pública, éste último dispone del Reglamento de Buenas Prácticas de Manufactura, cuyo cumplimiento consta como requisito obligatorio para el permiso de funcionamiento; adicionalmente las industrias deben cumplir con lo establecido en las normas técnicas INEN (FAO/OMS, 2005).

En el caso del Reglamento de Alimentos del Código de la Salud, que está desactualizado frente a los requerimientos de la OMC y el Codex Alimentarius y aunque no se ha armonizado con las normas internacionales, está en vigencia y es utilizado para reforzar la labor de los organismos de control en la vigilancia del cumplimiento de las reglamentaciones, que a su vez facilitan el comercio internacional de alimentos (FAO/OMS, 2005).

1.4.3 Leche y productos lácteos

Situación a nivel mundial

La oferta, demanda y comercio mundial de alimentos está influenciado por un conjunto de factores referidos al contexto macroeconómico esperado, a la evolución y localización de la población mundial, a las políticas de apoyo a la producción y comercialización en los distintos países y a las negociaciones internacionales (FAO, 2012).

En la última década el crecimiento del consumo mundial de lácteos dependió en gran medida del aumento poblacional, siendo aproximadamente el 70% del incremento en la demanda, y el 30% corresponde al crecimiento del consumo por habitante; que actualmente está concentrado en los países industrializados, por su alto poder adquisitivo y consumo per cápita, además del ritmo acelerado de crecimiento poblacional; razón por la cual, en las previsiones a largo plazo, no sólo importan las proyecciones del crecimiento económico promedio mundial, sino el dinamismo que tendrán en términos relativos todos los países (SEM, 2012).

A pesar de que en buena parte del mundo el sector lácteo está influenciado por medidas de protección o por subsidios y barreras que limitan el comercio, los desequilibrios entre la oferta y demanda en muchos países, así como el proceso de globalización y la creciente interdependencia económica han contribuido a promover el crecimiento del comercio (SEM, 2012).

Según la FAO-SMIA (2012) la producción total mundial de leche para el año 2011 se estimó en 730,1 millones de toneladas, representada por los 9 principales productores (Figura 1.1), siendo el primer lugar para Estados Unidos con 89 015 200 toneladas métricas/año y el menor productor Reino Unido con 14 246 000 toneladas métricas/año (FAOSTAT, 2013a); y con proyecciones de un aumento en la producción mundial de 2.7% llegando a 750.1 millones de toneladas para el año 2012 (FAO-SMIA, 2012).

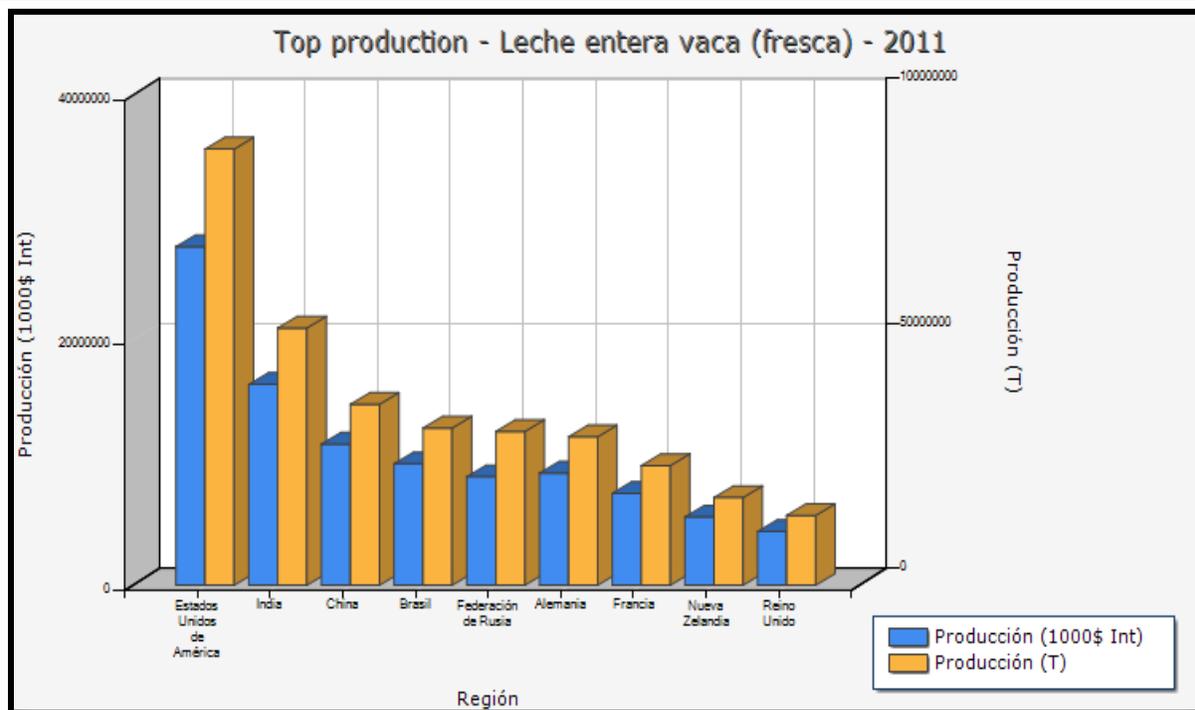


Figura 1.1.- Producción mundial de leche de vaca, entera y fresca, año 2011. Los diez mayores productores en toneladas métricas de leche (MT) y dólares internacionales (Int \$) de producción. *Fuente:* (FAOSTAT, 2013a).

Las previsiones del comercio mundial de productos lácteos demuestran que continuó expandiéndose en el 2012, la demanda se mantuvo firme, y se prevé que las importaciones alcancen los 52.7 millones de toneladas, equivalente de leche, donde el continente Asiático continuó siendo el mercado principal, seguido de África del Norte, Oriente Medio, América Latina y el Caribe (FAO-SMIA, 2012).

Se estima que la población mundial consume anualmente cerca de 500 millones de toneladas, en diversas presentaciones; el 85% corresponde a leche de vaca y el resto a otras especies como búfala 11%, cabra 2% y otras 2%; así en los últimos diez años, el consumo humano total de leche ha crecido a una tasa media anual del 1.6% observándose dos comportamientos paralelos, el de los países desarrollados y el de los países en desarrollo (SEM, 2012).

El consumo humano promedio per-cápita a nivel mundial es de 103.3 kg/año para el 2010, 104.5 kg/año estimado para el 2011 y 106.1 kg/año proyectado para el 2012; en cuanto a nivel de países desarrollados el estimado para el 2012 fue 237.8 kg/año, y a nivel de países en desarrollo 71.1 kg/año (FAO-SMIA, 2012), muy por debajo de los 188 kg recomendado por FAO (Indonesia 5 kg, Perú 55 kg, México 97 kg, Brasil 128 kg) (SEM, 2012).

En cuanto a los precios de los productos lácteos empezaron a bajar a mediados del 2011, al mejorar los suministros al mercado internacional, esta reducción se debió a un aumento de las disponibilidades de exportación pero también a una desvalorización del euro en relación con el dólar estadounidense; a pesar de las bajas recientes, los precios internacionales de los productos lácteos se mantienen más altos que las medias históricas (Figura 1.2) (FAO-SMIA, 2012).

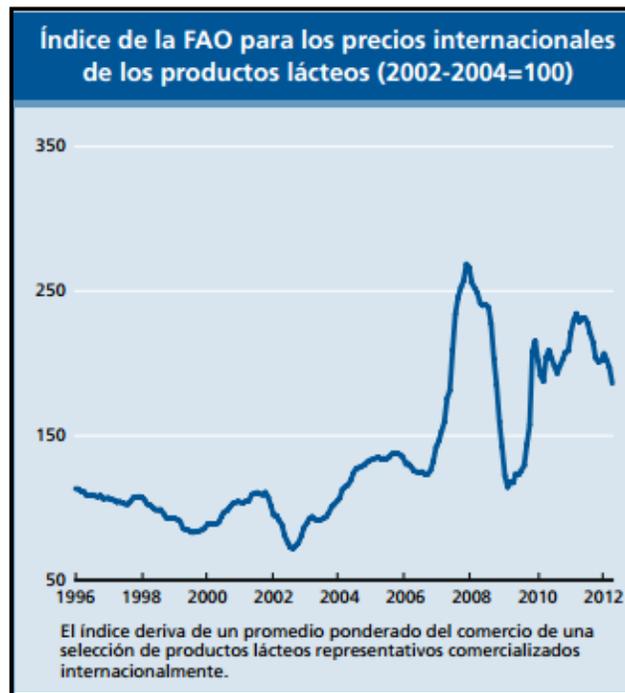


Figura 1.2.- Índice de la FAO para los precios internacionales de los productos lácteos, 2002-2004. Fluctuación de los precios a través de los años hasta el período 2012.

Fuente: (FAO-SMIA, 2012).

Situación en el Ecuador

Según la FAOSTAT, (2013b) la leche entera de vaca (fresca) es el tercer producto a nivel nacional (Figura 1.3) con mayor demanda con 6 375 320 toneladas métricas para el 2011.

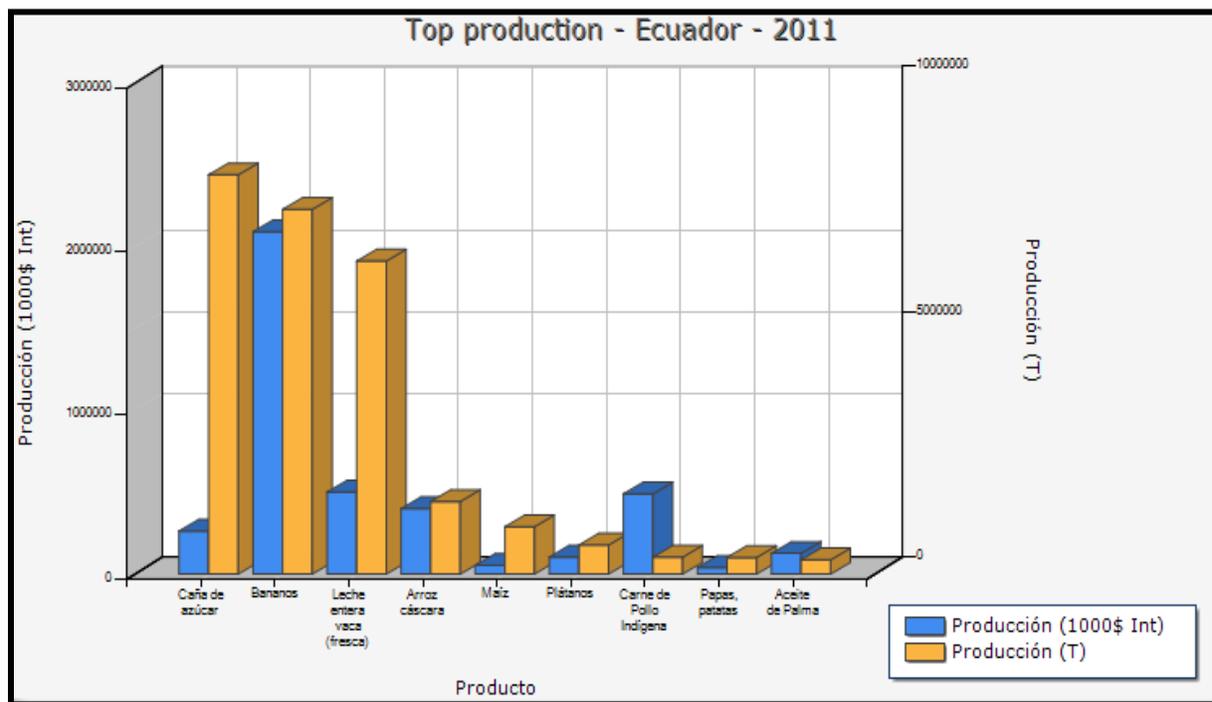


Figura 1.3.- Mayor Producción – Ecuador-2011. Principales productos que se comercializan en el país para producción en dólar internacional y toneladas métricas. *Fuente:* (FAOSTAT, 2013b).

El III Censo Nacional Agropecuario, (2000) determinó que en el país existen un total de 12 355 831 hectáreas ocupadas por 842 882 Unidades de Producción Agropecuarias (UPA’s) es decir fincas, haciendas y demás predios; deduciéndose según el informe que más del 48% de la superficie nacional está al servicio de los productores agropecuarios.

En cuanto a las cabezas de ganado (Figura 1.4), según el III Censo Nacional la mayor participación cantonal en el país tiene Santo Domingo con el 30.6%, seguido de Quito con

26% y en tercer lugar se encuentra el cantón Mejía con el 12.5%, que posee ocho parroquias dentro de las cuales se encuentra Machachi con 13 144 animales distribuidos en 518 predios: dentro de las razas de los animales que se encuentran en Mejía son *criollo* 43.48%, *mestizo sin registro* 31.23%, *mestizo con registro* 14.31%, *Holstein Freissan* 7.83%, *Brown Swiss* 1.73%, *Normando* 0.84% y finalmente *Jersey* 0.57%.

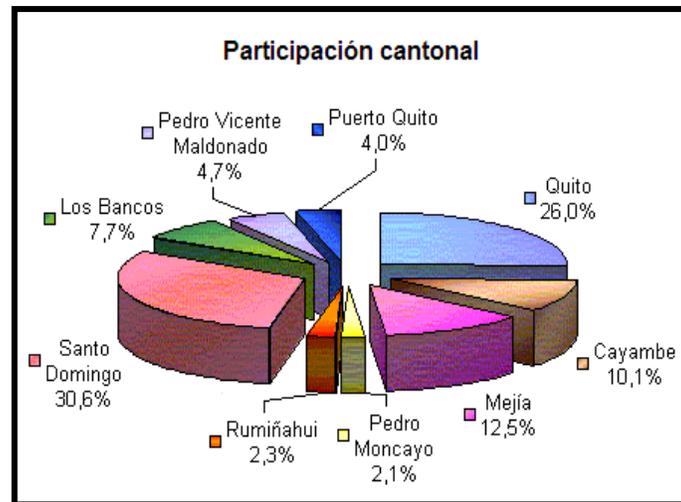


Figura 1.4.- Participación Cantonal. Porcentaje que cubre cada cantón en el Ecuador en cuanto a las Unidades Productoras Agropecuarias. *Fuente:* (III Censo Nacional Agropecuario, 2000).

Según el INEC, (2011) la producción total nacional de leche es de 6 375 321 L, de la cual la región Sierra aporta con el mayor porcentaje, 75.9%, 4 836 974 L/año, seguida de la Costa con el 16.6%, 1 055 934 L/año y el Oriente con el 7.6%, 482 415 L/año; destacándose en la región Sierra, la provincia de Pichincha con una producción de 970 516 L/año.

En cuanto a los litros de leche por vaca producidos, la Sierra tiene el mayor promedio de 6.7 L/vaca, debido principalmente a la gran cantidad de ganado lechero presente, 51.0% del total nacional, y a pastos naturales cultivados utilizados para su alimentación; en segundo lugar se encuentra la región Oriental con 4.7 L/vaca, con el 12.3% del ganado vacuno nacional y finalmente la región Costa con 3.6 L/vaca, con el 36.7% (INEC, 2011).

Además la producción de leche en el país está determinada de acuerdo al tamaño de la UPA, existiendo según el III Censo Nacional Agropecuario (INEC-MAG-SICA, 2002),

mayor producción en aquellas que tienen una extensión de 20 a menos de 50 hectáreas con 644 654 L, de 50 a menos de 100 ha con 531 871 L, seguida de aquellas 200 ha y más con 439 098 L.

Dentro de la región Sierra, según el III Censo Nacional Agropecuario la mayor producción de leche se encuentra en el cantón Mejía con 220 666 L, y el resto de cantones con menor producción como se observa en la Figura 1.5.

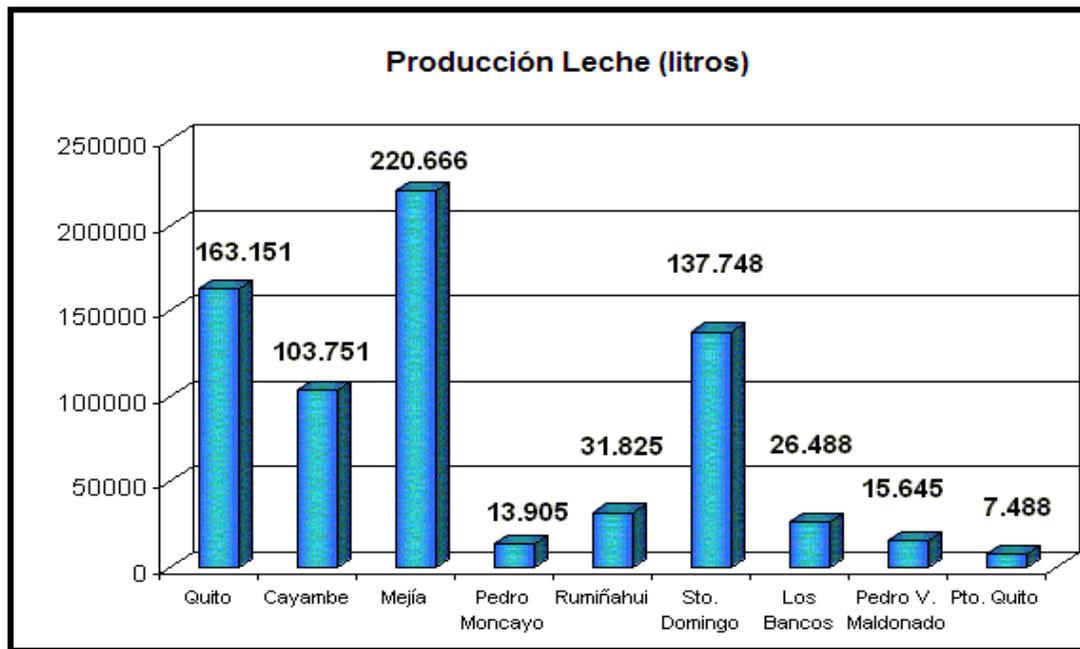


Figura 1.5.- Producción de leche. Litros de leche producidos por cada cantón de la región Sierra. *Fuente:* (III Censo Nacional Agropecuario, 2000).

Actualmente, el consumo per cápita de leche líquida en el país es de 100 L/año o 0.27 L. diarios según cifras del Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca, 2011.

1.4.4 Calidad de la leche

Al referirse al control de calidad de leche, se habla del uso de análisis aprobados para asegurar la aplicación de buenas prácticas, normas y reglamentos relativos a los productos lácteos (FAO, 2012); todo ello diseñado para asegurar que se puedan cumplir con las normas

aceptadas para la composición química y pureza, así como las concentraciones de distintos microorganismos (Jánosi & Baltay, 2004).

Un gran porcentaje de la población mundial consume productos animales diariamente, por ser nutritivos y necesarios para la salud y crecimiento; sin embargo, estos productos alimenticios son los más susceptibles a contaminarse, principalmente de forma microbiana, con *Escherischia coli*, *Salmonella* y *Campylobacter* (FAO/OMS, 2005).

Lamentablemente, la leche, carne y huevos son sustratos ideales para todos estos patógenos causantes de una alta mortalidad anualmente, especialmente en los países en desarrollo, ya que poseen una limitada base de recursos para la producción ganadera, quienes tienen la necesidad de utilizar todo lo que se produce de manera segura y eficiente; además el deterioro de los alimentos produce grandes pérdidas y puede afectar negativamente el comercio y la confianza del consumidor (O'Grady & Doherty, 2011; Paape *et al.*, 2000).

Por lo cual, la calidad de la leche implica grandes costos a nivel de toda la cadena de producción, comercialización y consumo (Rivas *et al.*, 2002), resaltando la necesidad de tener un sistema de control de calidad para la industria lechera, siendo así para el *productor*, *procesadores*, *consumidor*, *público* y *organismos gubernamentales de leche* quienes esperan tanto un precio razonable de acuerdo con la calidad como las garantías para la salud poblacional; lo que es posible a través de una institución con pruebas de calidad nutricional, funcional y sistemas de aseguramiento de inocuidad de acuerdo a las normas nacionales o internacionalmente aceptables (FAO, 2012).

Así, la alta calidad de la leche cruda equivale a la alta calidad del producto pasteurizado y los subproductos (Olechnowicz & Jaskowskj, 2012). Por ello la producción eficiente en condiciones higiénicas adecuadas es la clave para la producción lechera exitosa; siendo las principales limitaciones de los sistemas de pequeños productores, la alimentación inadecuada, el bajo potencial genético de los animales y los altos niveles de contaminación bacteriana, que conduce al deterioro antes de llegar al mercado; por lo que el primer paso para producir leche de buena calidad es a partir de animales sanos, asesoramiento y asistencia en la

producción, esencial para el éxito de la recogida y comercialización (O'Grady & Doherty, 2011).

1.4.4.1 Parámetros de calidad

La leche es un alimento muy nutritivo, el cual se compone de agua, grasa, proteína, lactosa, minerales, vitaminas, carbohidratos y enzimas (Karimuribo *et al.*, 2005), cuya composición depende de la especie de mamífero, alimentación (tipo y cantidad del forraje), ciclo de lactancia y número de lactaciones; y la cual mediante algunos de los parámetros físicos-químicos y microbiológicos permiten determinar su calidad (FAO, 2012). Además puede estar asociada con altos riesgos en la salud humana, especialmente si está relacionada con la presencia de patógenos zoonóticos y residuos de medicamentos antimicrobianos (Karimuribo *et al.*, 2005).

Así el punto de congelación no depende de la materia grasa y proteínas, sino de la sal junto con la lactosa, siendo casi constante; la gravedad específica (*densidad*) depende del contenido de proteína y grasa que en la leche está presente en forma de glóbulos muy pequeños, cuyo tamaño difiere marcadamente entre especies y razas de animales lecheros (FAO, 2012).

La proteína es rica en aminoácidos esenciales, por lo tanto, tiene un valor nutricional muy alto, se compone de 2 grandes grupos: *Caseína* alrededor del 80% y *las proteínas del suero o séricas* del 20-25% de la proteína total; las *enzimas* son un grupo de proteínas producidas por los organismos vivos, en la leche provienen ya sea de la ubre de la vaca (constituyentes normales y se llaman enzimas originales) o de bacterias que varían en tipo y número de acuerdo con la naturaleza y el tamaño de la población bacteriana, varias de ellas se utilizan para pruebas de calidad y control, entre las más importantes son la peroxidasa, catalasa, fosfatasa y lipasa (FAO, 2012).

La *lactosa* es un azúcar perteneciente al grupo de los hidratos de carbono y es fuente de alta energía; en cuanto a vitaminas, en la leche se pueden dividir en dos grupos, *solubles en grasa* (A, D, E y K) y *solubles en agua* (complejo B, entre las cuales están tiamina (B1),

riboflavina (B2), niacina, ácido fólico, piridoxina (B6), biotina, Kolin (B12) e inositol; y vitamina C) (FAO, 2012).

Además la leche contiene una serie de minerales cuya concentración total es menor que 1%, las sales minerales se presentan en solución en el suero de leche o caseína en los compuestos y no son constantes sus cantidades, las más importantes son sodio, potasio, en rangos de aproximadamente 1:3 (Hogeveen *et al.*, 2010), calcio y magnesio, y se producen como fosfatos, cloruros, citratos y caseinatos, siendo los más abundantes en la leche normal de potasio y sales de calcio (FAO, 2012).

Finalmente la leche siempre contiene glóbulos blancos de la sangre (leucocitos), el contenido es bajo en la leche de una ubre sana y la calidad del producto está en gran parte determinada por el número y los tipos de bacterias presentes (FAO, 2012).

A nivel mundial

A nivel mundial los parámetros de calidad bajo los cuales se rigen los países están establecidos por algunas organizaciones como las que se detalla en la Tabla 1.1, y el análisis global de los parámetros se puede encontrar en el Anexo 2, tomándose en cuenta a Estados Unidos por ser uno de los principales importadores de lácteos, Argentina país de la región cuya posición a nivel mundial en exportación de leche y sus derivados es inmejorable abarcando alrededor de 20 países, con productos con los más altos estándares de calidad internacionales gracias a sus actuales sistemas de producción y de manejo medio ambiental (CIL, 2004).

Adicionalmente, Colombia por ser uno de los países fronterizos al Ecuador que de manera similar, está actualmente analizando los indicadores de calidad de la leche (Calderón, *et al.*, 2006) y la FAO como Red internacional de sistemas de datos sobre alimentos (INFOODS) (FAO, 2013).

Tabla 1.1. Requisitos físico-químicos y bacteriológicos de la leche a nivel mundial. Componentes standard según las organizaciones que rigen en cada país.

Componentes standard/ Organizaciones Normalización	Estados Unidos		Otros países	
	Nutrient Data Laboratory ^a	FAO ^b	Argentina ^c	Colombia ^d
Proteína	7.86 g	3.4 – 4%	3.1 g	3.90 g
Grasa (lípidos totales)	8.11 g	4%	2.9 g	3.70 g
Azúcares totales	11.96 g	---	---	---
Sólidos no grasos	---	9%	---	---
Glóbulos blancos (leucocitos)	---	100 000 a 300 000 células/ml	Menos de 400 000 células/ml	---
Recuento de bacterias aerobias mesófilas	---	---	Menor a 100 000 UFC/ml	---

Fuente a. (NAL, 2012); b. (Argenfoods, 2011); c. (Bienestar Familiar, 2012; Robert, 2007), y d. (USDA, 2003).

A nivel del Ecuador

La leche cruda en el país está normalizada de acuerdo a la Norma NTE INEN 9:2012, dentro de la cual los requisitos específicos organolépticos para la leche son el color, blanco opalescente o ligeramente amarillento, el olor suave, lácteo característico, libre de olores extraños y el aspecto homogéneo libre de materias extrañas.

Los requisitos específicos físico-químicos y microbiológicos de la leche cruda, medibles para el presente proyecto, según la Norma NTE INEN 9:2012 se detallan en la Tabla 1.2, los restantes se encuentran en Anexo 3.

Tabla 1.2.- Requisitos específicos físico-químicos y microbiológicos de la leche cruda.

Requisito	Límite mínimo	Límite máximo
Materia grasa	3.0%	-
Sólidos totales	11.2%	-
Sólidos no grasos	8.2%	-
Proteína	2.9%	-
Recuento de microorganismo aeróbicos mesófilos REP	-	1.5 x 10 ⁶ UFC/cm ³
Recuento de células somáticas/cm ³	-	7,0 x 10 ⁵

1.4.4.2 Principales problemas con la calidad de la leche

Parámetros físico-químicos de la leche

Existen algunos parámetros físicos y químicos que permiten determinar la alteración de la leche y por ende su calidad, tal es así que el punto de congelación normal de la leche es un poco menor que el punto de congelación del agua debido a los componentes disueltos, principalmente lactosa y sales, este parámetro, siendo una de las características físicas más constantes de la leche, se utiliza para detectar su adulteración con agua; de manera similar mediante la medición de la densidad, ya que si es inferior a 1.01 kg/L, puede indicar contenido de agua más alto del normal y tiene como consecuencia la variación en el contenido de grasa y proteína por dilución (Giangiacomo, 2000).

Además enzimas como la lipasa que dividen la grasa en glicerol y ácidos grasos libres, pueden causar problemas en la calidad de la leche, pues el exceso de ácidos grasos libres tiene como consecuencia el sabor rancio; otro parámetro es la cantidad de minerales en la leche que al no ser constante puede causar graves problemas puesto que hacia el final de la lactancia, y más aún en el caso de enfermedad en la ubre, el contenido de cloruro de sodio aumenta y da a la leche un sabor salado, mientras que las cantidades de otras sales se reduce correspondientemente (FAO, 2012).

En cuanto al pH da una estimación aproximada de la acidez de la leche, indicación inmediata de su condición, siendo los valores normales de 6.6-6.8, valores más bajos generalmente se refiere a un proceso de acidificación debido al desarrollo de bacterias; y valores más altos generalmente significa la presencia de mastitis (Giangiacomo, 2000).

En cuanto a microorganismos con los cuales se puede contaminar fácilmente la leche podemos encontrar bacterias ácido lácticas que cambian el azúcar de la leche en ácido láctico, encontradas en el aire, establo, ropa y equipo de ordeño, bacterias de *Escherichia* cambian el azúcar de la leche en ácido láctico, forman gases y se encuentran principalmente en las heces, bacterias infecciosas se encuentran comúnmente en suelo, agua, equipo de ordeño, que no se

limpia adecuadamente y afectan a la proteína y, a veces la grasa en la leche, dándole un sabor malo; bacterias ácido butírico se encuentran en ensilaje de mala calidad y las bacterias de la *mastitis* presentes en la leche cuando la ubre de la vaca no es saludable y se ha desarrollado una infección (FAO, 2012).

Células somáticas (SCC)

A nivel de la industria lechera el contenido de células somáticas constituye un indicador de gran importancia entre los parámetros de calificación de la leche cruda, lo que en la práctica significa regular el control de mastitis en los rebaños (Jánosi & Baltay, 2004), higiene y calidad (Ogola *et al.*, 2007), pues cuando la glándula mamaria empieza a infectarse existe un rápido flujo de leucocitos polimorfonucleares que incrementa el SCC (Hogeveen *et al.*, 2010), cuya velocidad determina la severidad de mastitis (Burvenich *et al.*, 2003).

La leche se caracteriza por un cierto nivel de células somáticas de un animal a otro que varían de acuerdo al ciclo de lactancia (Rainard & Riollet, 2006), incluyen leucocitos polimorfonucleares (PMN) (1-11%), linfocitos (10-27%) y macrófagos (54-83%), siendo estos últimos los principales en vacas no infectadas (Lindmark-Mansson *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006); y aunque siempre contiene glóbulos blancos de la sangre (leucocitos), el contenido es bajo, pero aumenta generalmente en proporción con la gravedad de la enfermedad (Zhao & Lacasse, 2008), se ha visto que su presencia en la leche de una ubre sana se correlaciona inversamente con el riesgo de infecciones intramamarias (Rainard & Riollet, 2006).

Un incremento en SCC en la leche ocurre por una infección intramamaria (IMI), como la mastitis (Ryšánek *et al.*, 2005), acompañada o no por signos clínicos (Djabri *et al.*, 2002), como resultado del paso de las células inmunitarias de la sangre a la glándula (Kelly *et al.*, 2000), y con un cambio en las proporciones entre células somáticas, presentando incrementos de alrededor del 90% en PMN (Lindmark-Mansson *et al.*, 2006); el reclutamiento de neutrófilos de la circulación hacia el foco de infección es esencial en la defensa de la glándula mamaria contra la invasión de bacterias y la velocidad y cantidad de PMN reclutados, que varían de acuerdo al patógeno, son determinantes para el resultado de la infección (Rainard & Riollet, 2006).

El contenido de células somáticas y la producción de leche tienen una correlación negativa, lo que indica que gran parte del epitelio mamario ha sido dañado por la infección bacteriana y/o los fagocitos que son enviados en defensa por el sistema inmune del huésped (Burvenich *et al.*, 2003).

Además la composición de la leche también se ve afectada, presentando principalmente reducción del contenido de lactosa, grasa y caseína (Jánosi & Baltay, 2004), alteración de la calidad de la proteína, concentración de iones y minerales, incremento de la actividad enzimática y pH (Coulon *et al.*, 2002), por ende la consiguiente alteración de los subproductos; así el conteo de células somáticas ha sido utilizado para monitorear la prevalencia de mastitis en ganado vacuno lechero (Elmoslemany *et al.*, 2009a; Sant'Anna *et al.*, 2011), misma que mediante elevados niveles de PMN se ve incrementada (Kelly *et al.*, 2000), y resulta un indicador de la calidad de la leche e higiene en la producción de la misma (Elmoslemany *et al.*, 2009a; Sant'Anna *et al.*, 2011).

La principal causa de mayor variación en el conteo de células somáticas (SCC) se ha encontrado que es la presencia/ausencia de infección bacteriana dentro de las glándulas mamarias (Lievaart *et al.*, 2007; Pantoja *et al.*, 2009a; Ryšánek *et al.*, 2009), diferentes patógenos pueden causar el aumento de SCC en grados diferentes (Jánosi & Baltay, 2004), pues la magnitud del incremento varía de acuerdo al microorganismo involucrado en la IMI (Djabri *et al.*, 2002); es así que *Staphylococci* coagulasa-negativo presenta un bajo-aumento, de manera similar a *S. aureus* y *Streptococci* las cuales tienen alta patogenicidad, junto a coliformes y levaduras (Jánosi & Baltay, 2004).

Durante la inflamación de las glándulas mamarias los PMN producen metabolitos reactivos de oxígeno (Olechnowicz & Jaskowskj, 2012), por lo que cuando existe altos niveles de SCC/PMN se produce un incremento en la actividad de la catalasa y glutatión peroxidasa en la glándula, indicando que las membranas biológicas fueron atacadas por radicales libres (Hamed *et al.*, 2008), además de encontrarse una alta concentración de malondialdehído en la leche bovina (Suriyasathaporn *et al.*, 2006).

Otros factores no infecciosos que pueden tener un impacto moderado en el incremento del contaje, son también la edad del animal, lesiones en la ubre, estrés (FAO, 2012), paridad, número de lactancia, estación del año, ya que en algunos meses se presentan niveles más altos según los estudios de Skrzypek *et al.* (2004), tamaño de la granja, intervalo de muestreo, variabilidad diurna, condición corporal (BCS) y las diferencias innatas entre los cuartos de la ubre y las vacas (Breen *et al.*, 2009; Hagnestam-Nielsen *et al.*, 2009).

Hay que tomar en cuenta que los terneros son menos propensos a sucumbir a recaídas por casos anteriores de mastitis y es menos probable que estén persistentemente infectados y que registren elevados niveles de SCC en subsecuentes muestras de leche (Breen *et al.*, 2009). Además que éstos niveles varían con la etapa y meses de lactancia, pero no se afecta por la edad del primer parto (Haskell *et al.*, 2009); y está asociado a que las vacas que tienen menor conteo de células somáticas, poseen mayor rendimiento en la producción para la lactancia (Olechnowicz & Jaskowskj, 2012).

Las vacas que tienen bajos niveles de SCC, según las normas de referencia, son consideradas sanas, pero puede incluir animales afectados por una mastitis subclínica subaguda o crónica en uno o dos de sus cuartos; entonces el efecto de la dilución de la leche que proviene de los cuartos sanos permite que los niveles de la muestra se encuentre dentro de los límites (Buelow *et al.*, 1996), pero puede causar un riesgo de contagio para el resto del rebaño, principalmente si es causado por un patógeno como *S. aureus* (Jánosi & Baltay, 2004).

Cabe recalcar que existe mayor conteo de células somáticas cuando las muestras están infectadas con una mayor diversidad de patógenos (Olechnowicz & Jaskowskj, 2012). Es por esto que la correlación que existe entre el contaje de células somáticas y bacterias totales (TBC) (van Schaik *et al.*, 2005), constituyen métodos de referencia usados como indicadores de la calidad de la leche cruda (Elmoslemany *et al.*, 2009a) y en promedio la reducción en SCC se asocia con la disminución de TBC (Berry *et al.*, 2006).

Conteos de células somáticas mayores a 500 000 cel./mL están usualmente asociadas con una mastitis bovina, cuyos efectos son la reducción en la producción de leche y el tiempo

de vida útil de los productos lácteos (Rivas *et al.*, 2001), aunque en algunos países como el Ecuador los parámetros permitidos son aún más elevados llegando a 700 000 cel./mL (Norma NTE INEN 9:2012), estableciendo que SCC mayores a estos valores son más propensos a tener una IMI, ya que estas infecciones pueden permanecer del fin de una lactancia hasta el comienzo de la siguiente, con mayor riesgo de IMI en la siguiente lactancia, consecuencia de un mal proceso de curación durante el período de secado (Green *et al.*, 2007).

Por tanto el conteo de células somáticas puede ser usado para medir la IMI y la calidad de la leche de las vacas, rebaños y niveles de población (Schukken *et al.*, 2003; Wolff *et al.*, 2011), pero cabe recalcar que según estudios de Jánosi & Baltay, (2003) las vacas con mastitis se pueden identificar con éxito sólo por una evaluación conjunta entre el SCC y el estado bacteriológico de la leche de la ubre, porque la medición de uno solo parámetro, puede ser indicador poco fiable (Komine *et al.*, 2005), ya que si los datos del SCC de vacas individuales dentro de un rebaño están sesgadas hacia valores altos, es razonable esperar que la incidencia de mastitis clínica del rebaño también debe ser alto (Wolff *et al.*, 2011).

Contaminación bacteriana

Existen tres vías por las cuales se puede dar una contaminación bacteriana, (i) de la superficie externa de la ubre y pezón, (ii) por el equipo de ordeño, y (iii) por organismos que causan mastitis dentro de la ubre (Pantoja *et al.*, 2009). Por lo que el nivel y tipo de microorganismos existentes en la leche permiten monitorear la calidad higiénica en la que ha sido producida (Olechnowicz & Jaskowskj, 2012).

Mastitis

La mastitis es una enfermedad asociada con dos aspectos importantes en la calidad de la leche, el conteo de células somáticas y la leche visiblemente anormal, en caso de mastitis clínica (Hogeveen *et al.*, 2010). Constituye una de las mayores enfermedades de los animales lecheros, resultante de muchos casos de infecciones de las glándulas mamarias (Rainard & Riollet, 2006); es una reacción inflamatoria de uno o algunos cuartos mamarios (Zhao & Lacasse, 2008; Djabri *et al.*, 2002), que puede tener diferentes categorías como aguda o crónica, debido a la naturaleza de los síntomas, a la relación entre la cantidad de

tejido glandular mamario involucrado y la forma de la mastitis que finalmente resulta (Hogan & Smith, 2003).

Así, en la mastitis aguda la condición de la vaca es generalmente afectada por la fiebre, baja ingesta de alimentos, diarrea y deshidratación, la glándula mamaria está hinchada, caliente, dura y dolorosa y la leche cambia visiblemente, pues es aguada, con manchas y coágulos y de color amarillento o marrón (Hogan & Smith, 2003).

En cuanto a la mastitis crónica, la cual se subdivide en (i) *subclínica* o mastitis oculta, en la que los signos son imperceptibles por observación directa, es decir es asintomática (Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2005), se basa en la presencia de bacterias y en modificaciones citológicas de la leche (Djabri *et al.*, 2002), la ubre y la leche no cambian visiblemente, sólo las pruebas secundarias de laboratorio como CMT, muestran mastitis o el análisis del conteo celular somático u otro parámetro relacionado con la infección (Østerås & Sølverød, 2009).

(ii) *Leve* en donde la ubre puede estar ligeramente hinchada y dura, y la apariencia de la leche es ligeramente anormal, las pruebas de Paddle/laboratorio confirman el diagnóstico; finalmente, (iii) *indurativa* en la cual las glándulas con mastitis no pueden producir leche y el tejido glandular es remplazado por el tejido cicatricial por lo que la glándula es completamente dura y se contrae; el examen clínico es suficiente para establecer el diagnóstico; este tipo de mastitis no tiene tratamiento (FAO, 2012).

Dentro de los factores de riesgo que son determinantes de IMI y mastitis clínica durante los periodos de secado y lactancia temprana se encuentran la *edad* porque los cambios anatómicos del pezón con el tiempo tienen un efecto negativo en la resistencia local y general, ya que aumenta el diámetro del canal y disminuye su función de esfínter, el *uso de antibióticos en el periodo de secado* y la *salud de las ubres de la vaca* afectada por la condición del pezón y la integridad del canal del pezón, aspectos de manejo, SCC, número de lactancia, producción de leche y condición corporal (Green *et al.*, 2008; Gundelach *et al.*, 2011), además existe mayor riesgo en el cuarto trasero derecho, posiblemente por las condiciones higiénicas del área (Gundelach *et al.*, 2011).

Para prevenir esta enfermedad hay que asegurarse de que los animales tengan buena salud, higiene y que el lugar donde se encuentren esté en condiciones óptimas (Wolff *et al.*, 2011), ya que el incremento del riesgo de contraer mastitis clínica probablemente está asociado con un incremento de patógenos en el medio ambiente (Green *et al.*, 2007; Aland, 2003) y en el caso de que exista signos de enfermedad, los animales deben ser examinados y diagnosticados por un veterinario antes de iniciar el tratamiento (Wolff *et al.*, 2011).

Para los productores de leche los costos que esta enfermedad representa son altos a nivel mundial (Kalmus *et al.*, 2006; Riekerink *et al.*, 2006), pues incluyen el tratamiento y costos laborales veterinarios, cambios en la composición del lácteo reduciendo su calidad, pérdida de producción de las ubres gravemente afectadas, tiempo de retiro de leche y carne debido a los residuos de antibióticos post-tratamiento (Tsenkova *et al.*, 2001) y hasta la pérdida de algunos animales (Seegers *et al.*, 2003).

Mastitis y la influencia en la calidad de la leche

La mastitis causa alteraciones en la composición de la leche por los cambios fisiológicos ocasionados en la ubre (Hogeveen *et al.*, 2010), los cuales dependen de la respuesta inflamatoria, es decir, de la patogenicidad de la bacteria causante de la enfermedad, de la cantidad de tejido afectado en la glándula, especialmente si está incluida el área epitelial (Komine *et al.*, 2006; Pyörälä, 2003) y del estado de lactancia en el que ocurre (Seegers *et al.*, 2003).

Dentro de estos cambios se incluye la disminución de la capacidad sintética de la glándula, resultando en la disminución de las concentraciones de ciertos constituyentes de la leche (Komine *et al.*, 2006) como grasa, caseína y en menor proporción el contenido de lactosa e incremento del contenido de los iones sodio y cloro (Tsenkova *et al.*, 2001).

Además causa la alteración de las fracciones proteicas, ya que posee mayor actividad proteolítica, debido al incremento de plasmina proteinasa, la cual hidroliza la caseína, reduciendo la α_s - caseína y β -caseína y elevando la proteínas séricas, como albumina y α_1 - antitripsina (Jánosi & Baltay, 2004), ya que existe mayor permeabilidad capilar, lo que

facilita su paso desde la sangre (Poutrel *et al.*, 1983; Komine *et al.*, 2006), y γ -caseína en el total de la proteína de la leche (Urech *et al.*, 1999).

También eleva la actividad de enzimas como la N-acil-glucosaminidasa y el número de leucocitos provenientes de la sangre, llamados células somáticas (Jánosi & Baltay, 2004; Komine *et al.*, 2006), implicadas en los mecanismos de defensa de la ubre (Poutrel *et al.*, 1983), además existe la transferencia de otros componentes como iones Na y Cl, citratos, bicarbonatos, éstos últimos durante la inflamación de las ubres son los responsables de elevados niveles de pH (Ogola *et al.*, 2007).

Adicionalmente los residuos de medicamentos por tratamiento de la mastitis, reducen problemáticamente la calidad de la leche, pues primeramente se retira la carne y leche de su comercialización por un tiempo y a pesar de ello puede existir trazas de antibióticos (FAO, 2012); debido al peligro que representan en la salud humana se deben observar los tiempos de retiro de antibióticos estrictamente de acuerdo a la normativa de cada país.

Agentes causantes de la mastitis

La mastitis es frecuentemente relacionada con una infección bacteriana (Djabri *et al.*, 2002) o inclusive causada por hongos (Günter *et al.*, 2009), micoplasmas o algas (Zadoks & Middleton, 2011), patógenos cuya vía de infección es a través del canal del pezón y multiplicación en el interior del lumen de la glándula mamaria, especialmente después del ordeño (Zhao & Lacasse, 2008; Rainard & Riollet, 2006; Hogan & Smith, 2003); puede también ser parte de la enfermedad general y afectar a otros órganos (FAO, 2012).

La mayor diferencia entre las infecciones intramamarias causadas por distintos microorganismos, es el tiempo de duración en el que la bacteria persiste dentro de la glándula mamaria (Hogan & Smith, 2003). Los agentes causativos más predominantes de mastitis son las especies de *Streptococcus* y *Staphylococcus* (Zadoka & Fitzpatrick, 2009), es así que la IMI está relacionada comúnmente con el patógeno del género *Staphylococci* coagulasa-negativo (Pantoja *et al.*, 2009) generalmente después del parto y en medio de la etapa de lactancia, causando mastitis subclínica (Jánosi & Baltay, 2004).

Además se ha aislado *Staphylococcus aureus* el patógeno más asociado con esta enfermedad (Rivas *et al.*, 2001) y *Corynebacterium pyogenes* en casos de mastitis clínica (Olechnowicz & Jaskowskj, 2012) y *Escherichia coli* que es la causa más común de IMI en vacas lecheras (Zadoks & Middleton, 2011). *Pseudomona aeruginosa* (Sela *et al.*, 2007) y *Streptococcus agalactiae* (Jayarao *et al.*, 2004) la cual tiene una vida corta, evitando de esta manera una transmisión del patógeno dentro del rebaño (Zadoks & Fitzpatrick, 2009), y que necesita estar en la ubre de la vaca para sobrevivir, por lo tanto, no es difícil de erradicar si se trata a todas las vacas del hato (FAO, 2012).

Se ha encontrado también *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens* causantes de mastitis bovina (Zadoks & Middleton, 2011), *Streptococcus uberis* (Giannechini *et al.*, 2002) mastitis subclínica según estudios de Lasagno *et al.*, (2011) *Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus hyicus*, *Streptococcus canis*, *Enterobacter*, *Nocardia*, *Prototheca*, *Arcanobacterium pyogenes*, levaduras y hongos; estos últimos encontrados en menor frecuencia (Reyher *et al.*, 2011), otras como *Coxiella burnetti* uno de los patógenos menos conocidos causante de mastitis, reconocida por algunos autores (Philpot & Pankey, 1975).

Weller & Bowling, (2000) aislaron *S. aureus* y *Streptococcus uberis* que son los patógenos con mayor frecuencia causantes de mastitis y conocidos por su alta patogenicidad (Jánosi & Baltay, 2003), aunque en lactancias tempranas es estadísticamente significativo el incremento del riesgo de infección por *Staphylococcus aureus*, particularmente vacas que se encuentran en su primera o segunda lactancia (Zecconi & Piccinini, 2002).

Sin embargo las vacas también pueden tener mastitis debido a otras enfermedades como la metritis, neumonía, problemas digestivos o de baja nutrición que las hacen débiles (FAO, 2012).

Las dos formas principales por las cuales una vaca puede infectarse, son:

1. Cuando los terneros se infectan poco después del nacimiento mediante la lactancia por una ubre enferma y así contagiarse terneros lactantes entre sí, convirtiéndose en novillos con mastitis desde el primer día en que se ordeñan.

2. La transmisión de una vaca infectada a una no infectada, mediante las manos del ordeñador (FAO, 2012); esta fase de transmisión generalmente se refiere a tres semanas antes a tres semanas después del parto, tiempo crítico en el que el animal experimenta cambios nutricionales, fisiológicos y sociales que lo hacen más vulnerable a infecciones y enfermedades metabólicas (Kalmus *et al.*, 2006), pues el sistema inmune del bovino es menos capaz de combatir a los patógenos (Burvenich *et al.*, 2003).

Control de la mastitis

La habilidad de los productores para controlar algunas enfermedades entre ellas la mastitis depende en gran medida del acceso al conocimiento, facilidades de diagnóstico y a productos que permitan la salud del animal (Zadoks & Fitzpatrick, 2009), ya que puede ser minimizado tomando las debidas medidas de bioseguridad (Barkema *et al.*, 2009).

Es por esto que algunos factores de manejo de las granjas resultan en mayor probabilidad de contraer mastitis clínica, por lo que mantener las medidas de higiene necesarias es primordial para evitarlo, comúnmente están asociados con la administración de tratamientos y manejo de los establos y área de parto en el período de secado (Green *et al.*, 2007), ya que las fuentes comunes de contaminación para los bovinos son establos, estiércol, agua y suelo, especialmente por bacterias Gram-negativas, por lo que utilizando en los establos materiales inorgánicos como arena o piedra caliza triturada han tenido mejores resultados (Hogan & Smith, 2003).

Es así que las prácticas de manejo especialmente en el ordeño están relacionadas con la salud de las ubres en las vacas y por consiguiente resultan de fundamental importancia en el control y en sí en la prevención de formas de mastitis clínica y un bajo número de células somáticas en la leche (Haltia *et al.*, 2006; Olechnowicz & Jaskowskj, 2012), por lo que dependen de la automatización del ordeño, prácticas de inmersión, procedimientos de pre y post desinfección del pezón, examinación de las ubres antes del ordeño y durante el periodo de secado, el uso del CMT (Jánosi & Baltay, 2004), el corte de los pelos de las ubres y limpieza de los utensilios de ordeño (Olechnowicz & Jaskowskj, 2012).

Además la intensidad de la alimentación como el suplemento de selenio parenteral, está relacionado con bajos niveles de SCC, ya que la escasez de complementos dietéticos como α -tocoferol y selenio en la dieta de las vacas conlleva una actividad alterada de los PMN y su suplementación a través de la dieta diaria conduce a una rápida afluencia de leucocitos polimorfonucleares a bacterias intramamarias y su consiguiente muerte, así como la baja frecuencia y corta duración de mastitis clínica (Olechnowicz & Jaskowskj, 2012), que adicionalmente con la Vitamina E, las deficiencias de estos micronutrientes se relacionan con un incremento en la prevalencia y severidad de mastitis (Burvenich *et al.*, 2003).

Adicionalmente el uso de guantes (Olechnowicz & Jaskowskj, 2012), y que los recipientes utilizados para la limpieza y desinfección eficaz sean adecuados (Dufour *et al.*, 2011) hacen que se produzca leche de calidad con bajos contenidos bacterianos (Elmoslemany *et al.*, 2009a), ya que la mayoría de patógenos encontrados previamente han sido microorganismos ambientales (Ryšánek *et al.*, 2009). Cabe recalcar que aquellas vacas con alto nivel SCC y mastitis clínica deben ser, necesariamente ordeñadas al final y desinfectar el equipo después de cada ordeño (Olechnowicz & Jaskowskj, 2012).

La aplicación de vacunas previene altos contajes bacterianos seguidos de cambios intramamarios tanto para la duración de la infección como de los síntomas clínicos (Hogan & Smith, 2003). Además cuando las vacas de pasto están vacunadas reduce el riesgo de contraer mastitis clínica, por ejemplo con la vacuna de leptospirosis, aunque esta enfermedad no es claramente causa de mastitis, es posible que esta vacuna le confiera directa o indirectamente efectos de protección contra mastitis (Green *et al.*, 2007).

El enfriamiento de la leche previene el crecimiento de la mayoría de los tipos de bacterias en un grado considerable, ya que las bacterias causantes de infecciones pueden sobrevivir en el entorno, granero, herramientas de ordeño, manos, etc. lo que significa que la higiene general (Ogola *et al.*, 2007), tanto en el ordeño como en el rebaño son una parte importante del control de la mastitis, pues pueden prevenir la propagación de patógenos de mastitis contagiosa a algunos de los animales más susceptibles, incluso cuando existe un número sustancial de vacas infectadas (Smith *et al.*, 2005).

El uso de desinfectantes germicidas en los pezones inmediatamente antes del ordeño, es decir realizar un presellado, puede reducir la incidencia de nuevas infecciones durante la lactancia (Hogan & Smith, 2003) y curar las IMI existentes, en ayuda con la administración intramamaria de antibióticos (Godden *et al.*, 2003) y el uso posterior de selladores de pezones para asegurarse de que las bacterias no invadan el canal del pezón y causen mastitis (Robert *et al.*, 2006), aunque el empleo de antisépticos de pezón internos como métodos de control no reducen significativamente el riesgo de infecciones con bacterias coliformes (Hogan & Smith, 2003; Berry & Hillerton, 2007).

Tratamiento de la mastitis

En el caso de que las vacas presenten mastitis, se debe tratar la enfermedad en cuanto se la diagnostica y se puede realizar una infusión de una preparación de antibiótico en el canal del pezón, como tratamiento normal y en casos agudos aplicando un tratamiento sistémico, aunque se debe tener en cuenta la resistencia de ciertas bacterias (Pol & Ruegg, 2007) como *Staphylococcus* por lo que se debe hacer una prueba de sensibilidad a antibióticos (FAO, 2012). A pesar que los antibióticos son muy útiles para el tratamiento, éstos no protegen el daño causado en la glándula (Zhao & Lacasse, 2008).

Los antibióticos depositados por vía intramuscular o intravenosa dejan residuos en la leche y la carne, por lo que se los debe desechar, sea cual fuere el tratamiento, la duración del tiempo de espera y desecho es normalmente sujeto a las prescripciones de las autoridades de cada país (Smith *et al.*, 2005).

En vista del hecho que el conteo de células somáticas de la leche de vacas con mastitis subclínica tiende a incrementarse cuando avanza la etapa de lactancia, una efectiva terapia de secado debe usarse para restaurar la salud de la ubre (Jánosi & Baltay, 2003).

Además muchos experimentos han demostrado que el mejor momento para el tratamiento de la mastitis subclínica es en el comienzo del periodo seco, después del último ordeño (FAO, 2012), ya que reduce las infecciones por patógenos contagiosos (Sears & McCarthy, 2003), la tasa de curación de la terapia es mayor que la del tratamiento durante la lactancia, el número de nuevas infecciones de mastitis durante el periodo seco se reducen,

mayor tiempo de recuperación de tejido dañado y no existe el riesgo de retirar la leche debido a su contenido de antibióticos, lo que implica beneficios económicos; además algunos veterinarios recomiendan tratar todos los cuartos de todas las vacas para evitar el uso de pruebas de mastitis subclínica (FAO, 2012).

Brucelosis

La brucelosis es una de las mayores enfermedades zoonóticas ocupacionales de distribución mundial (Al Dahouk *et al.*, 2007; Gopaul *et al.*, 2008), que puede presentarse con un amplio espectro de manifestaciones clínicas (Shamelian, 2000) y ocasionalmente ser fatal en humanos (Godfroid *et al.*, 2005), además de permitir problemas reproductivos en un significativo número de especies domésticas (Gopaul *et al.*, 2008; Xavier *et al.*, 2009), por lo que anualmente es causante de grandes pérdidas económicas y sociales que afectan al ganadero, a la economía agropecuaria del país y la salud pública humana (D'pool & Díaz, 2005).

En América del Sur, es la enfermedad más grave en el ganado con tasas de prevalencia entre el 0.1 y 20.3% (Lucero *et al.*, 2008), sin embargo se ha encontrado una prevalencia del 25% en el ganado lechero, en Argentina (Samartino, 2002), mientras que Ecuador posee prevalencias que van del 4-10.62% dividiéndose en regiones de alta y baja prevalencia y una región libre de enfermedad, Las Islas Galápagos (MAG-SESA, 2009); además el Centro Internacional de Zoonosis (CIZ) (2003) ha encontrado en el Cantón Mejía una prevalencia del 5,5% en trabajadores de la ganadería.

La brucelosis es una infección crónica granulomatosa (Pappas *et al.*, 2005), causada por diferentes bacterias intracelulares del género *Brucella* (OIE, 2012; Gopaul *et al.*, 2008; Al Dahouk *et al.*, 2007; USDA, 2003) cada una de las cuales tiende a infectar a una especie animal específica, pero no son exclusivas puesto que la mayoría son capaces de infectar a otras especies animales porque es un organismo que normalmente se asocia con otra especie hospedadora (Xavier *et al.*, 2009; Ibarra, 2008). Puede presentarse como aguda, subaguda o localizada, crónica o subclínica (Shamelian, 2000), afectando a bovinos, porcinos, ovinos,

caprinos, equinos, camélidos y perros, otros rumiantes, algunos mamíferos marinos y al ser humano (Cutler *et al.*, 2005).

Brucella spp. es un patógeno que no se multiplica en el medio ambiente, pero es usualmente transmisible directamente entre huéspedes (Xavier *et al.*, 2009), pueden penetrar al cuerpo a través de mucosas, conjuntivas, piel erosionada o piel sana; los vectores que pueden diseminar la enfermedad son perros, animales silvestres hasta el hombre; y cuyas características clínicas varían según la especie y hospedero (D'pool & Díaz, 2005).

Se conoce seis especies *B. abortus* asociada al ganado y/o bisonte, *B. suis* cerdos, liebres, renos y en ocasiones bovinos (D'pool & Díaz, 2005), *B. melitensis* ganado ovino, caprino y en ocasiones bovino (Memish & Balkhy, 2004; D'pool & Díaz, 2005; Xavier *et al.*, 2009) siendo el agente zoonótico más importante (Godfroid *et al.*, 2005; Pappas *et al.*, 2006), *B. canis*, perros, *B. ovis* ovejas y *B. neotomae* ratas de madera del desierto (Acha & Szyfres, 2001); las primeras cuatro especies son patogénicas para humanos (Corbel, 2006; Al Dahouk *et al.*, 2007; Gopaul *et al.*, 2008), por la presencia del lipopolisacárido rugoso o liso que permite la correlación con la virulencia de la enfermedad en los seres humanos (Pappas *et al.*, 2005).

Adicionalmente, en los últimos años se han clasificado *B. ceti* en cetáceos, *B. pinnipedialis* en pinnípedos (Pappas *et al.*, 2005; Foster *et al.*, 2007), éstas especies de *Brucella* marina son capaces de infectar a humanos, ya que se pueden transmitir a través del contacto directo (Xavier *et al.*, 2009), provocando grandes trastornos neurológicos (Hernández *et al.*, 2008); y *B. microti* en topillos (Schoiz *et al.*, 2008).

La transmisión natural de la enfermedad es a través de la ingestión de las brucellas presentes en fetos abortados, membranas placentarias y en las descargas uterinas, pues en los líquidos del parto del animal infectado existe una gran cantidad de bacterias, que pueden sobrevivir varios meses en el medio externo, principalmente en estiércol, agua, suelo y fetos, especialmente en condiciones frías y húmedas (D'pool & Díaz, 2005), y siguen siendo infecciosas para otros animales, que se contagiarán al ingerirlas; además las bacterias también colonizan las ubres contaminando la leche (D'pool & Díaz, 2005; OIE, 2012); por el consumo

de agua, alimentos contaminados, el lamido de los genitales de animales enfermos, transmisión venérea por toros infectados a través del semen (D'pool & Díaz, 2005).

La transmisión a humanos es a través del contacto directo con partes de animales infectados como placentas tras un aborto o fetos, por consumo de productos contaminados con leche sin pasteurización procedente de los mismos y a través de la inhalación de aerosoles infectados, consumo de órganos como hígado o bazo sin cocinar (Memish & Balkhy, 2004; Pappas *et al.*, 2005); la enfermedad puede ser asintomática o presentar síntomas tales como fiebre intermitente o irregular, cefalea, debilidad, sudor abundante, escalofríos, pérdida de peso, dolor general y transpiración maloliente (Pappas *et al.*, 2005); también puede producirse la infección de órganos como el hígado o el bazo (OIE, 2012).

La enfermedad en los animales se caracteriza por el aborto, trastornos reproductivos, epididimitis, orquiditis, vesiculitis, e infección de las glándulas accesorias en los machos (D'pool & Díaz, 2005), alteración de la fertilidad y subfertilidad en sus huéspedes animales principales y disminución del rendimiento de leche en el ganado e higromas y nacimiento de terneros débiles (D'pool & Díaz, 2005; CFSPH, 2007). Los animales suelen recuperarse, y después del primer aborto son capaces de procrear a pesar de que pueden continuar excretando bacterias (OIE, 2012), que están presentes en el útero, leche, feto y placenta (D'pool & Díaz, 2005).

Como la primera línea de defensa del huésped frente a microorganismos de *Brucella* son los leucocitos polimorfonucleares, aunque es resistente al daño causado por estas células (Pappas *et al.*, 2005), y macrófagos activados, que migran al sitio de la invasión bacteriana (Madkour, 2001), está relacionada con el incremento de células somáticas dentro de la leche (Xavier *et al.*, 2009); los anticuerpos contra *Brucella* spp. se pueden encontrar en múltiples fluidos, pero los ensayos serológicos se realizan principalmente en la sangre y la leche (Ibarra, 2008).

Aunque cabe sospechar la presencia de brucelosis en caso de signos clínicos como abortos, la confirmación exige pruebas serológicas, seguidas de pruebas de laboratorio prescritas para aislar e identificar a la bacteria como prueba gold estándar que dura de días

hasta semanas (Al Dahouk *et al.*, 2007); además la vigilancia con fines de detección puede pasar por la realización sistemática de pruebas serológicas y de análisis de la leche, con técnicas rutinarias sobre la base de ensayos indirectos como la prueba del anillo en leche (MRT) o Brucellosis Ring Test (BRT) (Nielsen, 2002)

El MRT según estudios de Ibarra (2008) realizados en Ecuador, tiene una sensibilidad y especificidad de 46.11 y 94.92%, respectivamente, aunque incluye algunas deficiencias como reacciones falsas debido al factor de dilución, procedencia de la muestra de leche, después del parto, etapas finales del ciclo de lactancia, cuartos con mastitis o de animales vacunados (Gall *et al.*, 2002).

Control de la brucelosis

La mejor manera de prevenir la brucelosis humana es luchar contra la infección en los animales, por lo que en las zonas donde la enfermedad es endémica suele utilizarse la vacunación para reducir la incidencia de la infección, la vacuna más utilizada es la cepa 19 (S19) cuyos títulos post-vacunales suelen interferir con la convencional prueba serológica (Nicoletti, 2001).

Una vez que un animal resulta positivo es necesario sacrificarlo, pues la enfermedad tiende a ser crónica y es difícil de erradicarla en el rebaño; además ningún tipo de medicamento usado hasta el momento ha mostrado resultados en el tratamiento y recuperación de los bovinos afectados (D'pool & Díaz, 2005).

Tratamiento de la brucelosis

Aunque muchos órganos pueden estar involucrados permitiendo complicaciones focales, la brucelosis es raramente fatal en humanos; a pesar de ello los pacientes son discapacitados por semanas hasta meses (Al Dahouk *et al.*, 2007). Una terapia adecuada es necesaria para prevenir complicaciones o recaídas (Shamelian, 2000), que incluyen tratamientos antibióticos prolongados combinados (Pappas *et al.*, 2005; Al Dahouk *et al.*, 2007), que puedan penetrar los macrófagos y actuar en el medio ambiente intracelular ácido (Pappas *et al.*, 2005).

1.4.5 Análisis de lácteos

Citometría de flujo

La citometría de flujo es un método basado en los valores de dispersión de la luz para distinguir células viables de no viables, que es una ventaja frente a otros métodos como la citología convencional (Rivas *et al.*, 2001).

En la industria láctea se ha utilizado éste método para la determinación del contenido de células somáticas, medido mediante un equipo denominado Fossomatic, en el cual el conteo de partículas se fundamenta en el conteo de núcleos de células teñidos, principalmente leucocitos con alto contenido de ADN y células epiteliales con bajo contenido de ADN (Jánosi & Baltay, 2004).

Estudios previos han demostrado que existe correlación significativa entre la citología manual y la citometría de flujo, además se ha validado como un método de diagnóstico para la identificación de mastitis bovina que puede detectar verdaderos negativos, es decir, que no tienen mastitis y han reportado que la sensibilidad y especificidad es similar o mayor a la citología, 100 y 83%, respectivamente (Jánosi & Baltay, 2004).

Además la citometría de flujo puede ser utilizada para identificar antígenos de superficie, que pueden arrojar luz en la identificación celular y la función asociada; distinguir tipos de células viables de otra materia también presente en la muestra, combinando el perfil obtenido por la luz dispersada con información de células específicas identificadas por anticuerpos monoclonales fluorescentes, esto es utilizado principalmente para contar e identificar células en la leche las cuales contienen glóbulos de grasa; cuantificar neutrófilos en la leche de vacas sanas y vacas inoculadas con endotoxinas; y evaluar linfocitos en leche de glándulas no infectadas y glándulas con infecciones espontáneas por *Staphylococcus* (Rivas *et al.*, 2001).

Aunque para mayor confiabilidad de los resultados de SCC en muestras de leche, según Lievaart *et al.*, (2011) se debe probar en diferentes series de datos, países e intervalos de muestreo, mientras que otros estudios no han encontrado efecto de la variabilidad en la

precisión de los resultados para diferentes intervalos de muestreo (Olechnowicz & Jaskowski, 2012).

La citometría de flujo se ha utilizado en algunos estudios para determinar las células somáticas en diferentes estaciones del año, mediante el equipo Fossomatic 90, obteniendo un promedio de 499.2×10^3 / mL de leche que a través de los tres años de estudio fue aumentando (Rajčević *et al.*, 2003).

En estudios realizados por Gundelach *et al.*, (2010) se determinó el conteo de células somáticas usando el Fossomatic serie 400, basado en citometría de flujo, para determinar que la terapia antibiótica en el período de secado, la edad y la salud de las ubres del animal son factores que contribuyen a las infecciones intramamarias y a la mastitis clínica, durante el período de secado y las etapas de lactancia temprana.

Otras metodologías

Existen otras metodologías mediante las cuales se pueden determinar tanto parámetros físico-químicos como el conteo de células somáticas o bacterianas en la leche cruda.

Así, se han usado otras técnicas para la medición del SCC, como el coulter counter el cual cuenta el número de impulsos eléctricos resultantes del paso de las partículas entre dos electrodos (IDF, 1995), y el filtro de DNA que consiste en el filtrado de una solución de leche mezclada con detergente (Triton X-100 EDTA) a través de una membrana con poros finos; un procedimiento colorimétrico basado en la reacción con el ADN de las células es entonces utilizado para determinar el contenido de ADN que está relacionado directamente con el número de células presentes en la muestra (Timms & Schultz, 1987; Ward & Schultz, 1972).

Otra técnica con el mismo objetivo es el uso de espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR) el cual en una región de 1100 a 2500nm mide el conteo de células somáticas, cuya determinación se ha encontrado que está relacionada con cambios en la composición de la leche, siendo las proteínas y la concentración iónica, los factores que mayor influencia ejercen en el espectro de la leche con elevados SCC (Tsenkova *et al.*, 2001).

Según Rivas *et al.*, (2001), se utiliza una citología manual de leche (recuentos diferenciales de leucocitos), técnica estándar utilizada para determinar la presencia o ausencia de procesos inflamatorios en la leche bovina con bajos SCC; la citología solamente permite contar un número bajo de células por muestra, no diferencia células viables de no viables y no evalúa la función celular.

Para determinar la mastitis bovina en vacas lecheras se han usado muchos otros indicadores diagnósticos como California Mastitis Test (CMT), un método simple indirecto que mide el número de células somáticas presentes en la leche mediante la estimación del contenido de ADN en la misma, coágulos, la actividad de N-Acetil- β -D-glucosaminidasa (NAGasa) (Pyörälä, 2003), y la concentración de lactoferrina (Lf) (Komine *et al.*, 2006).

El uso de métodos basados en PCR, en la investigación y diagnóstico de mastitis han dado alternativas de control y mayor entendimiento de su epidemiología (Zadoks & Fitzpatrick, 2009), pudiendo mejorar el diagnóstico aumentando la sensibilidad de detección de algunos organismos como *S. aureus* (Graber *et al.*, 2007) o inclusive de aquellos que son no viables o difíciles de cultivar (Barlow *et al.*, 2008).

Algunos autores como Lee *et al.*, (2006) para la determinar el número total de colonias por mililitro de muestra utilizan el método tradicional de recuento en placa, el cual se basa en incubar una cantidad medida de muestra, haciendo diluciones o no, en placas de agar a 37°C por algunas horas y se cuenta el número de UFC (Unidades Formadoras de Colonia).

1.5 Hipótesis

1. Los parámetros de calidad de la leche bovina de haciendas grandes, medianas y pequeñas de la parroquia Machachi, ubicada en la Provincia de Pichincha, se encuentran dentro de los rangos establecidos por la Norma INEN, ya que es una zona con una alta densidad de ganado bovino y de gran producción lechera.

2. Existe diferencia entre el número de animales en el hato y se puede determinar la correlación entre células somáticas y concentración bacteriana, y el diagnóstico de *Brucella* spp. mediante Milk Ring Test con el cultivo específico.

CAPITULO 2: MATERIALES Y METODOS

2.1 Diseño del estudio

La presente investigación es el análisis de la calidad de la leche basada en los parámetros físico-químicos, bacteriológicos y células somáticas mediante estadística descriptiva de las variables, relación entre variables y análisis de correspondencia múltiple, junto al estudio de exploración de corte transversal o de prevalencia (Ávila, 2007) de brucelosis bovina a través de Milk Ring Test (MRT). Finalizando con el análisis de factores determinantes de los datos tomados mediante encuestas epidemiológicas de cada animal (Anexo 8); para lo que se realizó un muestreo estratificado para haciendas, tomando muestras de leche de los bovinos ordeñados de las haciendas grandes, medianas y pequeñas de la parroquia Machachi, provincia de Pichincha. Dentro de la evaluación de la calidad de la leche se utilizó la citometría de flujo y el análisis con infrarrojos por la transformada de Fourier.

2.2 Participantes

Haciendas grandes, medianas y pequeñas de la parroquia Machachi, sitios en los que se realizó los muestreos.

Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (Agrocalidad). Tumbaco-Ecuador. Lugar donde se procesó las muestras, obtuvo e interpretó los resultados.

Centro Internacional de Zoonosis (CIZ), ubicado en la Universidad Central del Ecuador, 3er Piso, Edificio del Servicio Médico, Ciudadela Universitaria. Quito-Ecuador. Lugar donde se procesó las muestras, obtuvo e interpretó los resultados.

2.2.1 Personas

Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (Agrocalidad)

Dr. Luis Ramos. Director de los Laboratorios.

Dra. Nahir Dugarte. Laboratorio de Control de Calidad de Leche.

Centro Internacional de Zoonosis

Washington Benítez O., Ph.D. Director.

Gustavo Echeverría. Asesor científico.

Paulina Fernández. Asesor científico.

Lenin Ron M.Sc. Bioestadista.

Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE

María Augusta Chávez M.Sc. Directora de Tesis.

Ing. Verónica Marcillo. Codirectora de Tesis.

2.3 Zona de estudio

2.3.1 Descripción de la zona de estudio

El presente estudio se llevó a cabo en las haciendas grandes, medianas y pequeñas de la parroquia Machachi con una superficie de 415.93 km², ubicada en el cantón Mejía, provincia de Pichincha a una altitud de 3.100 msnm, en las coordenadas latitud: S 0° 40' / S 0° 30' y longitud: W 78° 45', limitada al norte por las parroquias Tambillo, Pintag y cantón Rumiñahui, al sur la provincia de Cotopaxi, al este la parroquia Pintag y provincia Napo y al oeste las parroquias Alóag y Aloasí.

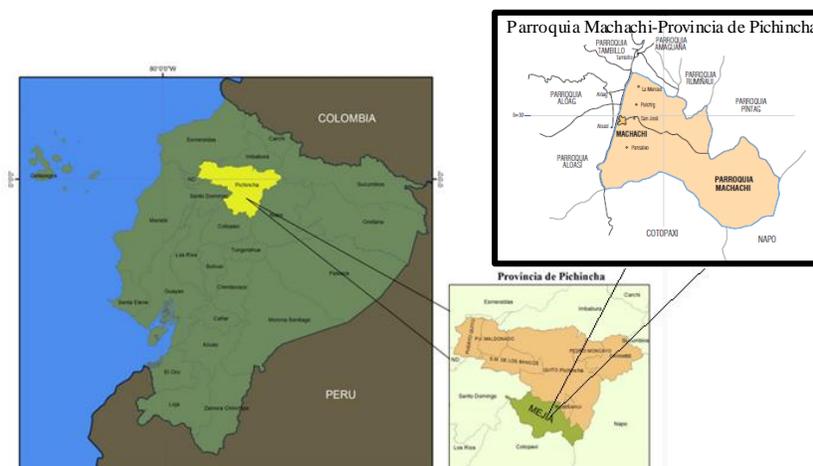


Figura 2.1.- Mapa de la Zona de estudio.

Las haciendas productoras de leche ordeñan dos veces al día, un promedio de 30, 70 y más de 80 animales, siendo pequeñas, medianas y grandes haciendas, respectivamente,

todos los días, con un promedio de 24 L/día de leche por animal. El muestreo se realizó en el ordeño de la tarde, entre la 1 a 6 pm. durante un periodo comprendido entre 13 de Enero y el 8 Abril de 2013.

2.4 Período de tiempo de investigación

La investigación se realizó entre Enero del 2013 a septiembre del 2013. El muestreo entre el 13 de Enero y el 8 de Abril de 2013 y las muestras se procesaron en la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (Agrocalidad) y el Centro internacional de Zoonosis de Enero a Abril del 2013. Ver Cronograma Anexo 1.

2.5 Diseño Estadístico

El cálculo de las haciendas muestreadas se realizó mediante fórmula:

$$n = \frac{k^2 * s^2}{e^2}$$

$$n = \frac{1,96^2 * 15^2}{5^2}$$

$$n = 34 \text{ Haciendas}$$

Donde;

k = Confiabilidad al 95%

s = Varianza

e = Precisión del 5%

Destacando que para establecer la varianza se tomó en cuenta el rango con mayor variabilidad entre los datos que oscilan actualmente los parámetros de la leche y según los datos proporcionados por el laboratorio de la Universidad Salesiana de Cayambe (Anexo 7) corresponde a las células somáticas.

Además según estudios y observaciones previas realizadas en trabajos publicados por investigadores del Centro Internacional de Zoonosis se estableció que los factores

ponderadores de muestreo estratificado para haciendas son 20% haciendas grandes, 10% haciendas medianas y 70% haciendas pequeñas, siendo 7, 4 y 23, respectivamente de la muestra antes calculada; tomando en cuenta que todos los animales que pertenecen al mismo predio están expuestos a factores similares como alimentación, enfermedades y manejo, se estableció tomar una muestra del 25% de los animales que se ordeñan dentro de las haciendas grandes, de la misma manera para medianas y en las pequeñas el número total.

Posterior a los análisis de laboratorio (citometría de flujo, análisis con infrarrojos por la transformada de Fourier y MRT) de todas las muestras recolectadas se realizó los análisis estadísticos, junto a los datos tomados de las encuestas epidemiológicas de cada animal, determinando la calidad de la leche mediante el análisis descriptivo y asociación de las variables, calculando la prevalencia aparente de Brucelosis por MRT, buscando factores influyentes en la calidad del lácteo.

2.5.1 Análisis Descriptivo de las variables

Para este análisis se calculó la media, mínimo, máximo, desviación estándar y el coeficiente de variabilidad, obteniendo finalmente el histograma, de los datos tabulados de las encuestas.

Media: mediante la ecuación seguida por Gutiérrez y de la Vara, (2008).

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Donde;

n= número de muestras

x_i = dato de cada muestra

Desviación Estándar: mediante la ecuación seguida por Gutiérrez y de la Vara, (2008).

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}}$$

Donde;

n= número de muestras

x_i = dato de cada muestra

\bar{x} = media

Coefficiente de variabilidad

$$cv = \frac{S}{\bar{x}}$$

Donde;

S= desviación estándar

\bar{x} = media

Métodos para el análisis de los resultados de Laboratorio

2.5.2 Análisis Descriptivo

Para este análisis se realizó los cálculos del apartado 2.5.1 de los resultados obtenidos en laboratorio.

2.5.3 Análisis de Asociación entre variables

Para determinar las variables que presentan asociación, en el presente estudio, se realizó el cálculo del *Chi-cuadrado* (X^2), el test exacto de *Fisher*, con las siguientes fórmulas:

***Chi-cuadrado* (X^2):** mediante la ecuación seguida por Galindo, (2008).

$$X_{obs}^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(n_i - f_i)^2}{f_i}$$

Donde;

n_i = frecuencia observada

f_i = frecuencia esperada

k = categoría

Test exacto de *Fisher*: mediante la ecuación seguida por Velasco & Wisniewski, (2001).

$$F = \frac{U/v_1}{V/v_2}$$

Donde;

U, V = variables aleatorias

v_1, v_2 = grados de libertad

2.5.4 Análisis de correspondencia múltiple

Para determinar la asociación global entre varias variables de las encuestas epidemiológicas y los resultados obtenidos, se realizó un gráfico de correspondencia múltiple, basado en la distancia *Chi-cuadrado*.

2.5.5 Prevalencia

Para la determinación de la frecuencia de Brucelosis existente en el ganado bovino en el momento del estudio, expresado en porcentaje, se utilizó la siguiente fórmula (Esper & Machado, 2008).

$$P = \frac{\text{número total de casos MRT positivos}}{\text{número total de animales muestreados}} \times 100$$

2.5.6 Análisis de Factores Determinantes

Para determinar las variables que presentar riesgo se realizó el cálculo del *Chi-cuadrado* (X^2), el test exacto de *Fisher* y del *Odds ratio* con la siguiente fórmula (Gordis, 2005).

Odds ratio

$$\text{Odds ratio} = OR = \frac{\text{Posibilidad de que un animal expuesto presente la enfermedad}}{\text{Posibilidad de que un animal no expuesto presente la enfermedad}} = \frac{ad}{bc}$$

Si la exposición no se relaciona con la enfermedad, el Odds ratio será igual a 1; si se relaciona positivamente, será mayor que 1; si se relaciona negativamente, será menor a 1 (Gordis, 2005).

Intervalo de confianza al 95% del Odds ratio (IC 95%): según la fórmula seguida por Esper & Machado, (2008).

$$\ln(\text{Limite inferior}) = \ln(OR) - z * DS[\ln(OR)]$$

$$\ln(\text{Limite superior}) = \ln(OR) + z * DS[\ln(OR)]$$

Donde:

DS = desviación estándar

OR= odds ratio

$$z = 1.96$$

2.6 Procedimientos

2.6.1 Trabajo de campo

2.6.1.1 Muestreo

Se realizó un muestreo estratificado para haciendas, en el que se tomó muestras de leche una vez por semana durante el ordeño normal de la tarde de las haciendas de la parroquia Machachi, provincia de Pichincha, en un total de 7, 4, 23 haciendas grandes, medianas y pequeñas, respectivamente. Se conservó las muestras en frascos estériles a 4°C, para el posterior trabajo de laboratorio. En las haciendas se tomó 421 muestras.

Materiales

- Frascos estériles.
- Marcador permanente.
- Cooler.
- Hielo químico.
- *Equipo de bioseguridad:* botas, overol, guantes y mascarillas.

Procedimiento

- Se almacenó las muestras de leche cruda, en tubos estériles, dentro de la caja térmica para su transporte al laboratorio.
- Ya en el laboratorio se analizó inmediatamente.

2.6.2 Trabajo de Laboratorio

Los protocolos de laboratorio detallados a continuación, fueron manejados en los Laboratorios de Control de Calidad de Leche de Agrocalidad y de microbiología del Centro Internacional de Zoonosis. Además para el análisis de la calidad de la leche en los diferentes equipos, los protocolos están estandarizados por el fabricante.

2.6.2.1 Conteo de células somáticas

Para el conteo de células somáticas se hizo uso del equipo Fossomatic FC, el cual mediante citometría de flujo hizo el recuento celular (FOSS, 2012a), basando su cálculo en la tinción fluorométrica del material nuclear mediante bromuro de etidio (IDF, 1995).

Materiales

- Equipo Fossomatic FC
- Carriles: 10 muestras cada uno
- Guantes
- Cofia
- Mascarilla
- Papel toalla desechable
- Baño maría seteado a 40°C

Reactivos

- Foss Clean Kit
- Rinse
- Fossomatic Reagent C (Dye)
- Fossomatic Reagent E (Buffer)
- Fossomatic Reagent D (Clean)

Procedimiento

- Se preparó los reactivos antes mencionados según las especificaciones del equipo (Anexo 4).
- Se llevó a las muestras a 40°C en el baño maría y se colocó en el orden deseado en los respectivos carriles del equipo.
- Se colocó los carriles en el equipo y se procedió a programar al equipo para el análisis, para posteriormente obtener los resultados mediante el software Foss Integrator workstation.

2.6.2.2 **Conteo bacteriano**

El conteo bacteriano se realizó mediante el equipo BactoScan FC, el cual emplea citometría de flujo de células para proporcionar un sistema que cuenta bacterias individuales - IBC (sólo las bacterias viables) presentes en la leche cruda, permitiendo con esto un mayor control de la higiene cuando se recibe directamente del hato (FOSS, 2012b).

Materiales

- Equipo BactoScan FC
- Guantes
- Cofia
- Papel toalla desechable
- Mascarilla
- Baño maría seteado a 40°C

Reactivos

- Solución de stock de líquido portador
- Solución de stock de reactivo colorante
- Solución colorante de stock para Enzima Mini Users
- Solución de stock de preservación para muestra de control bacteriano
- Solución de rehidratación para muestra de control bacteriano
- Líquido portador pronto para usar
- Solución blanca pronta para usar
- Solución de final del día pronta para usar
- Solución de Lavado pronta para usar
- Reactivo de incubación pronto para usar
- Muestra de control bacteriano pronta para usar

Procedimiento

- Se preparó los reactivos antes mencionados según las especificaciones del equipo (Anexo 5).
- Se precalentó las muestras a 40°C.

-
- Se programó el equipo para el análisis de la concentración bacteriana.
 - Se corrió 3 soluciones blanco.
 - Se corrió el control bacteriano.
 - Se pasó manualmente una a una las muestras para el análisis, para posteriormente obtener los resultados mediante el software Foss integrator Workstation.

2.6.2.3 Parámetros físico-químicos

Para el análisis de los parámetros físico-químicos se usó el equipo MilkoScan FT+, que se basó en el análisis con infrarrojos por la transformada de Fourier (FTIR). Trabaja con la región media de los infrarrojos del espectro de 3-10 μm correspondiente a 1000 – 5000 cm^{-1} (FOSS, 2012c).

Materiales

- Equipo MilkoScan FT+
- Guantes
- Cofia
- Mascarilla
- Papel toalla desechable
- Baño maría seteado a 40°C

Reactivos

- Solución de líquido de cero
- Solución de limpieza
- Muestra en blanco
- Solución de limpieza para la cubeta y el enjuague por la célula de flujo
- Solución FossClean

Procedimiento

El MilkoScan FT+ forma en conjunto con el Fossomatic FC el equipo denominado CombiFoss, los cuales pueden analizar las muestras al mismo tiempo, así que el

procedimiento es el mismo mencionado anteriormente para el conteo de células somáticas. La preparación de los reactivos se especifica en el Anexo 6.

2.6.2.4 Milk Ring Test (MRT)

El diagnóstico de la brucelosis bovina se realizó utilizando el antígeno *B. abortus* teñida con hematoxilina, basándose en el principio de que el anticuerpo (IgA, IgM e IgG1) (Sutra *et al.*, 1986) unido a los glóbulos de grasa de la leche se una al antígeno llegando a la cima de la leche y se forme una capa de color (Nielsen *et al.*, 1996).

Materiales

- Tubos de vidrio para Ring Test.
- Micropipetas.
- Guantes
- Cofia
- Mascarilla
- Papel toalla desechable
- Incubadora a 37°C

Reactivos

- Antígeno para Ring Test, suspensión de *Brucella abortus* cepa 1119-3, de Weybridge, inactivada, y coloreada con hematoxilina.

Procedimiento

- Se colocó las muestras y el antígeno en temperatura ambiente, aproximadamente 15 minutos.
- Se homogenizó las muestras de leche.
- Se dispuso en los tubos de vidrio 1mL de leche a analizar y 50µL de antígeno en cada tubo y se homogenizó.
- Se incubó a 37°C por 1 hora.
- Se realizó la lectura, mediante la observación del anillo y el fondo.

2.6.2.5 Cultivo específico de *Brucella* spp.

Brucella es un microorganismo de crecimiento lento, lo que hace que tenga un alto nivel de contaminación con otros organismos encontrados frecuentemente en el material de diagnóstico como la leche, por lo que el uso de una variedad de antibióticos es comúnmente adicionados al agar base para un aislamiento exitoso (Stack *et al.*, 2002), la confirmación de la presencia del microorganismo es a través de medios selectivos, necesarios para el aislamiento de *Brucella* spp., el medio selectivo Farrell ha sido desarrollado para el aislamiento de *B. abortus* de muestras de leche (Marín *et al.*, 1996). Las colonias de *Brucella* luego de la incubación por 3-4 días, se presentan con un diámetro de 1-2mm, transparentes de color miel cuando se observan a contra luz, de aspecto liso, contornos regulares y abombadas.

Materiales

- Cajas petri
- Hisopo estéril
- Guantes
- Cofia
- Mascarilla
- Centrifuga (Labnet Internacional, C9424)
- Cabina de bioseguridad (ESCO, Class II BSC)
- Incubadora a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ con presencia de $8 \pm 2\%$ de CO_2

Reactivos

- Medio de cultivo específico Farrell.

Procedimiento

- Las muestras de leche positivas a MRT se dividió en dos submuestras, la primera se centrifugó a $2\ 250\ \text{g} \pm 500\ \text{g}$ durante aproximadamente 15 minutos.
- Se extendió un volumen de 200 μL de muestra primeramente de la crema y luego del sedimento, sobre 1/3 de la superficie del medio de cultivo en la caja Petri, con la ayuda de un hisopo estéril.

- Se incubó a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en presencia de $8 \pm 2\%$ de CO_2 .
- Se observó macroscópicamente luego de tres días y todos los días siguientes durante 7 días.

2.6.2.5.1 Preparación de Medio de Cultivo específico Farrell

Materiales

- Erlenmeyer estéril
- Plancha de calentamiento
- pH-metro
- Autoclave

Reactivos

- Columbia Blood Agar Base
- Suero de caballo
- *Brucella* Selective Supplement SR0083A- OXOID. Antibióticos y antimicóticos: Cicloheximida 50mg, Bacitracina 12 500 IU, Sulfato de polimixina 2 500 IU, Vancomicina 10 mg, Acido nalidixiqua 2.5 mg y Nistatina 50 000 IU).

Procedimiento

- Se homogenizó el medio base en un frasco estéril con agua destilada-desmineralizada y se llevó a ebullición durante 15 minutos.
- Luego, se adicionó 4 g/L de agar y se autoclavó por 15 minutos a 121°C .
- Posteriormente, se adicionó suero estéril de caballo 5 mL/L de medio base, el cual se descomplementó por calentamiento a 56°C durante alrededor de 30 minutos.
- Se adicionó los antibióticos y antimicóticos (10 mL/ 50mL de medio base), reconstituídos en 5 mL H_2O + 5 mL Etanol.

2.6.2.6 Identificación Bacteriana mediante Medios de Cultivo específicos para el diagnóstico de Gram (-)

Las pruebas bioquímicas han sido utilizadas para diferenciar bacterias, éstas se fundamentan en demostrar si el microorganismo es capaz de fermentar azúcares, la

presencia de enzimas, la degradación de compuestos, la producción de compuestos coloreados, etc. (Vizcarrombo & Gutiérrez, 2002).

Materiales

- Espátula
- Balanza
- Erlenmeyer
- Agitadores magnéticos
- Tubos de vidrio con tapa rosca
- Cajas petri
- Guantes
- Gradilla
- Pipetas desechables
- Plancha de calentamiento
- Autoclave

Reactivos

- Agua destilada
- Medios de cultivo:
 - McConkey
 - Triple Sugar Iron. TSI
 - Simmons Citrate
 - Caldo MR-VP
 - Medio Fenilalanina
 - Medio Arginina
 - MIO Medium
 - Lysine Iron Agar
- Reactivos
 - Reactivo de Kovacs
 - Rojo Metilo
 - Cloruro Férrico

Alfa naftol

Azul de Bromotimol

- Urea

Procedimiento

- Se pesó cada medio de cultivo, según las especificaciones de cada reactivo y se disolvió en agua destilada.
- Luego, se homogenizó por ebullición a 200°C por aproximadamente 10 minutos.
- Posteriormente, se dispensó en tubos de tapa rosca y se autoclavó a 121°C por 20 minutos, se dejó enfriar y solidificar.
- Se dejó en refrigeración durante dos días para observar cualquier contaminación.
- La segunda sub-muestra de leche positiva a MRT, se sembró en cada uno de los medios de cultivo.
- Finalmente, se incubó a 37°C por 24 horas y se observó crecimiento.

CAPITULO 3: RESULTADOS

3.1 Descripción general de la muestra

Las 421 muestras tomadas en las haciendas de la parroquia Machachi, pertenecieron a 409 bovinos y 12 tanques de enfriamiento, de las cuales se recolectó el 80.20% (335/421) de haciendas grandes, 11.49% (51/421) medianas y 8.31% (35/421) pequeñas, los datos obtenidos de las muestras se pueden observar en los Anexos 8 y 9.

Los datos fueron categorizados para realizar un mejor análisis, como se observa en la siguiente tabla:

Tabla 3.1.- Descripción de la muestra y categorización de los datos, Machachi-Ecuador 2013.

Variable	Categorización	Resultado
Edad	Jóvenes (≤ 3 años)	17.36% (71/409)
	Adultos (> 3 años)	82.64% (378/409)
Raza	Holstein	88.26% (361/409)
	Cruza (Holstein/Otras)	8.31% (34/409)
	Otras (Brown Swiss, Jersey, Normando, Sueca roja)	3.42% (14/409)
Partos	Pocos (0-2)	46.21% (189/409)
	Medios (3-6)	52.81% (216/409)
	Muchos (más de 7)	0.98% (4/409)
Abortos	SI	11.25% (46/409)
	NO	88.75% (363/409)
Etapa de Lactancia	Fase Temprana (desde parto hasta 2 meses)	25.43% (104/409)
	Fase Estable de alta producción (2-4 meses)	24.21% (99/409)
	Fase de descenso lento (4-7 meses)	23.23% (95/409)
Producción ^a	Fase de descenso acelerado (7-10 meses)	27.14% (111/409)
	Baja	31.05% (127/409)
	Media	36.92% (151/409)

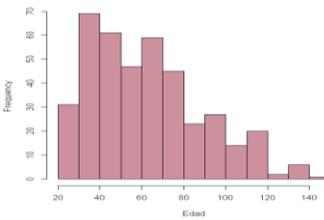
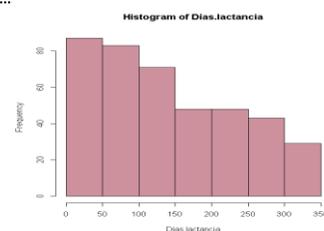
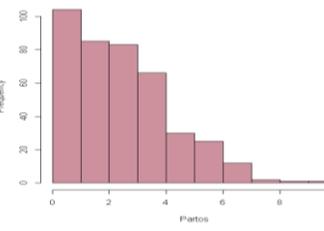
	Alta	32.03% (131/409)
Alimentación	Balancedo (suplemento, productos naturales, pasto)	90.46% (370/409)
	Natural (alimentos naturales, pasto)	9.54% (39/409)

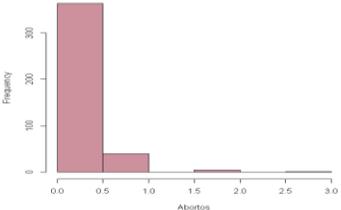
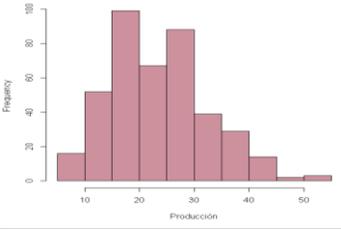
^a: la categorización de este parámetro se determinó según los percentiles 33 y 66, siendo 19 y 27 L/día, respectivamente; entre los cuales está la agrupación “Media”.

3.2 Análisis descriptivo de las variables

Para este análisis se empleó el paquete Rcmdr en el programa R *versión 2.15.3*, obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 3.2.- Resultados de los análisis descriptivos de las variables, de los datos tomados del ganado lechero bovino en Machachi-Ecuador 2013.

Variable	Análisis	Histograma	Observaciones
Edad	$\bar{x} = 63$ meses mín.= 20 meses máx.=145 meses $S = 26.601$ $cv = 42.08\%$		Alta variabilidad entre los datos de edad.
Días de Lactancia	$\bar{x} = 141$ días mín.= 2 días máx.= 319 días $S = 94.309$ $cv = 66.83\%$		Disimetría de los datos
Partos	$\bar{x} = 3$ mín.= 0 máx.= 10 $S = 1.756$ $cv = 59.73\%$		Alta variabilidad entre los datos.

Abortos	$\bar{x} = 0.1296$		No existe simetría en la distribución de los datos.
	mín.= 0		
	máx.= 3		
	S = 0.390		
	cv = 301%		
Producción	$\bar{x} = 24.09\text{L/día}$		Simetría de los datos
	mín.= 6L/día		
	máx.= 52L/día		
	S = 8.744		
	cv = 36.3%		

\bar{x} : media; mín: mínimo; máx: máximo; S: desviación estándar; cv: coeficiente de variabilidad.

3.3 Resultados de los análisis de Laboratorio

La utilización de citometría de flujo y el análisis con infrarrojos por la transformada de Fourier permitieron evaluar los parámetros de calidad de la leche; determinándose el cumplimiento de la NORMA INEN.

Descripción general de los resultados

Cabe recalcar que los resultados fueron categorizados de acuerdo al cumplimiento o no de la NORMA INEN, como se observa en la siguiente tabla:

Tabla 3.3.- Descripción y categorización de los resultados de laboratorio, Machachi-Ecuador 2013.

Variable	Categorización	Resultado
Células Somáticas	Norma ($\leq 300\ 000$ cel./mL) ^a	79.22% (324/409)
	Aceptable ($300\ 000 < x \leq 700\ 000$) cel./mL	7.82% (32/409)
	Fuera de Norma ($> 700\ 000$ cel./mL)	12.96% (53/409)
Grasa	Norma ($\geq 3\%$)	15.16% (62/409)
	Fuera de Norma ($< 3\%$)	84.84% (347/409)
Proteína	Norma ($\geq 2.9\%$)	9.78% (40/409)
	Fuera de Norma ($< 2.9\%$)	90.22% (369/409)

Sólidos Totales	Norma ($\geq 11.2\%$)	21.76% (89/409)
	Fuera de Norma ($< 11.2\%$)	78.24% (320/409)
Sólidos no grasos	Norma ($\geq 8.2\%$)	77.75% (318/409)
	Fuera de Norma ($< 8.2\%$)	22.25% (91/409)
Bacterias ^b	Norma ($\leq 100\ 000$ UFC/mL) ^a	95.84% (392/409)
	Aceptable ($100\ 000 < x \leq 1.5 \times 10^6$) UFC/mL	2.93% (12/409)
	Fuera de Norma ($> 1.5 \times 10^6$ UFC/mL)	1.22% (5/409)

Todos los datos se tomaron de la Norma INEN Ecuador; ^a: Dato tomado de la normativa Argentina; ^b: los datos de laboratorio de obtuvieron en IBC/mL, por lo que se los transformó con el factor=0.14 (Bohorquez, 2013).

Tomando en cuenta las mismas categorizaciones para las muestras de los tanques de enfriamiento, los resultados se observan en la Tabla 3.4.

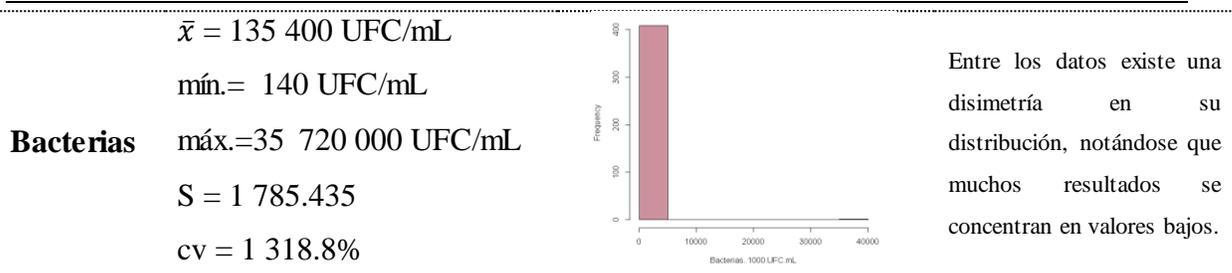
Tabla 3.4.- Descripción general según la categorización de las muestras de los tanques de enfriamiento tomados en las haciendas de Machachi-Ecuador 2013.

Células Somáticas	
ACEPTABLE	16.67%
FUERANORMA	16.67%
NORMA	66.67%
Grasa	
FUERANORMA	16.67%
NORMA	83.33%
Proteína	
FUERANORMA	8.33%
NORMA	91.67%
Sólidos Totales	
FUERANORMA	8.33%
NORMA	91.67%
Sólidos no grasos	
FUERANORMA	8.33%
NORMA	91.67%
Bacterias	
FUERANORMA	0%
ACEPTABLE	16.67%
NORMA	83.33%
MRT	
Negativo	83.33%
Positivo	16.67%

Análisis descriptivo de los resultados

Tabla 3.5.- Análisis descriptivo de los resultados de las muestras tomadas en Machachi-Ecuador 2013.

Variable	Análisis	Histograma	Observaciones
Células Somáticas	$\bar{x} = 494\ 300$ cel./mL. mín.= 4 000 cel./mL. máx.= 14 330 000 cel./mL. $S = 1\ 499.791$ $cv = 303.4\%$		La mayoría de los datos tienden a valores bajos de SCC; y los pocos que presentan valores altos crean una sobre dispersión.
Grasa	$\bar{x} = 1.781\%$ mín.= 0.260% máx.=10.330% $S = 1.366$ $cv = 76.7\%$		Disimetría en la distribución de los datos.
Proteína	$\bar{x} = 3.307\%$ mín.= 1.515% máx.=4.920% $S = 0.375$ $cv = 11.35\%$		Baja variabilidad entre los datos.
Sólidos Totales	$\bar{x} = 10.410\%$ mín.= 4.605% máx.=18.340% $S = 1.456$ $cv = 13.98\%$		Simetría en la distribución de los datos.
Sólidos no grasos	$\bar{x} = 8.552\%$ mín.= 4.030% máx.=9.965% $S = 0.556$ $cv = 6.49\%$		Baja variabilidad entre los datos.



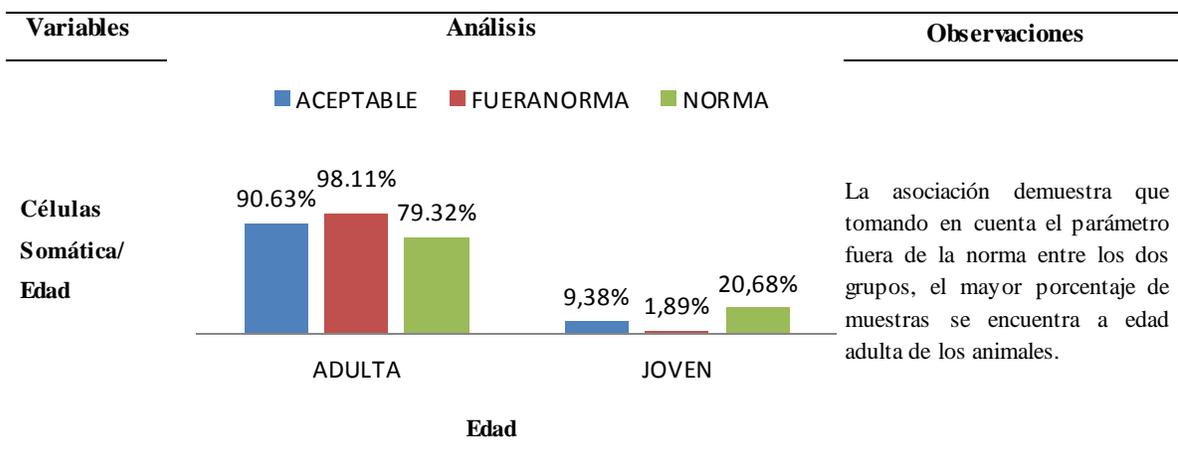
\bar{x} : media; mín: mínimo; máx: máximo; S: desviación estándar; cv: coeficiente de variabilidad.

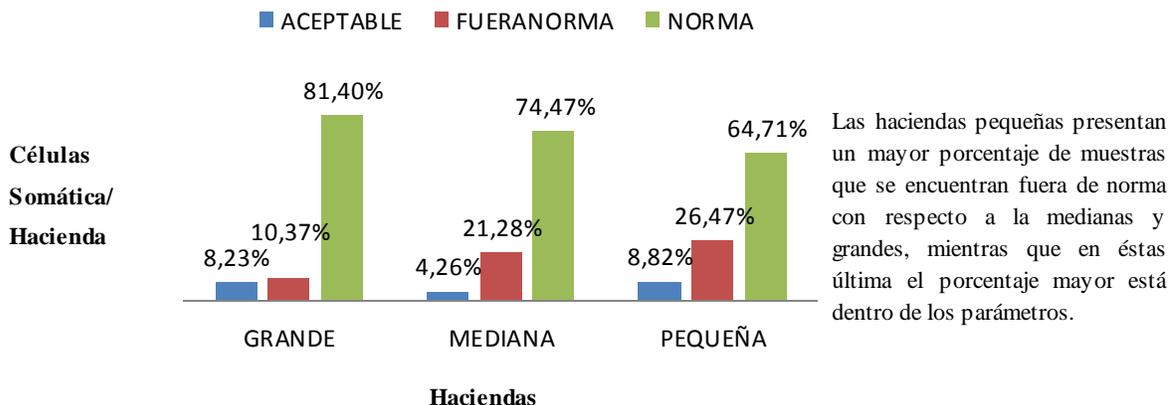
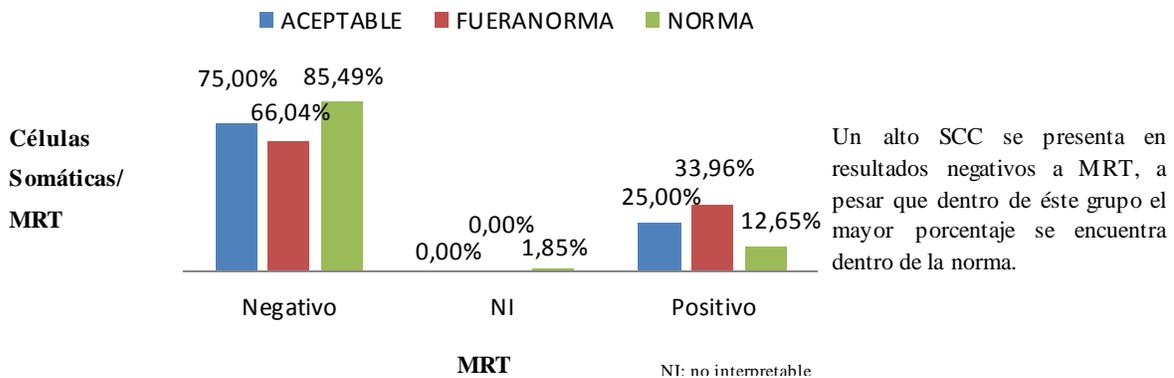
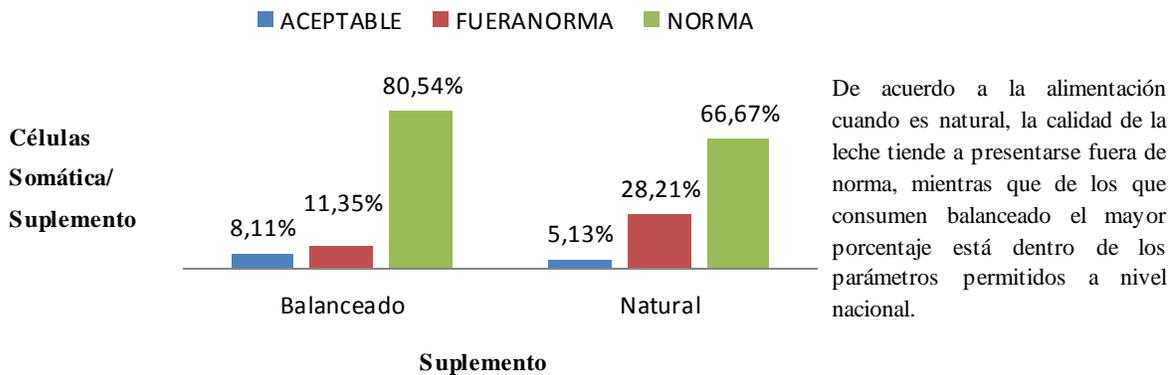
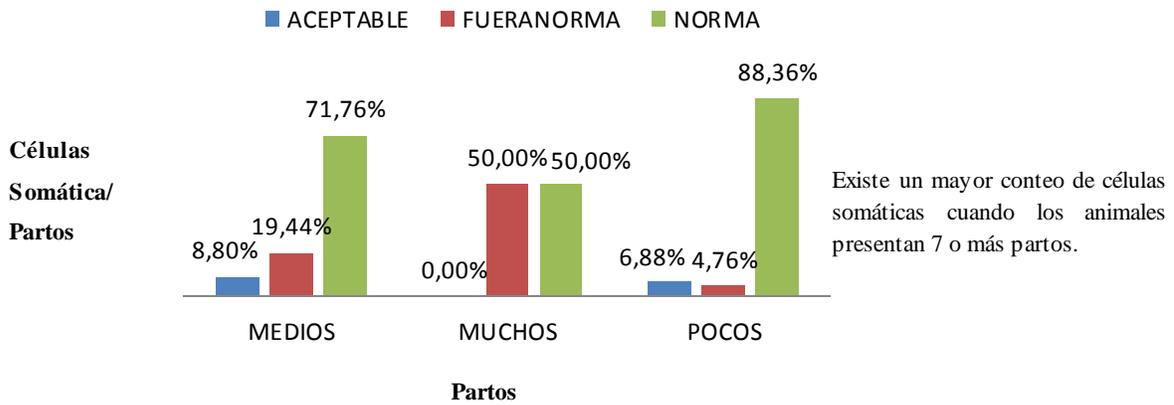
Análisis de Asociación entre Variables

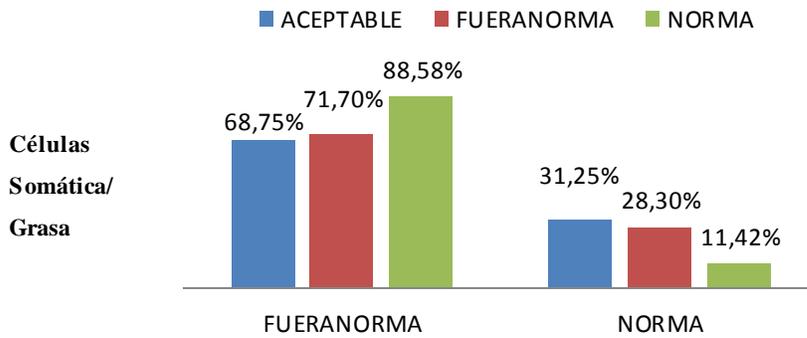
Para determinar la asociación entre las variables se realizó la prueba de *Chi-cuadrado* (X^2) y el test exacto de *Fisher*, asociando los diferentes parámetros mediante tablas dinámicas empleando el paquete *Rcmdr*; en el programa *R versión 2.15.3*, obteniendo los resultados indicados en el Anexo 10.

En el análisis global, como se puede observar en la tabla del Anexo 10, existen algunas asociaciones que presentan diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$), para las cuales se realizó en análisis mediante gráficos dinámicos, como se observa a continuación:

Tabla 3.6.- Resultados de las asociaciones estadísticamente significativas entre células somáticas y las diferentes variables, Machachi-Ecuador 2013.

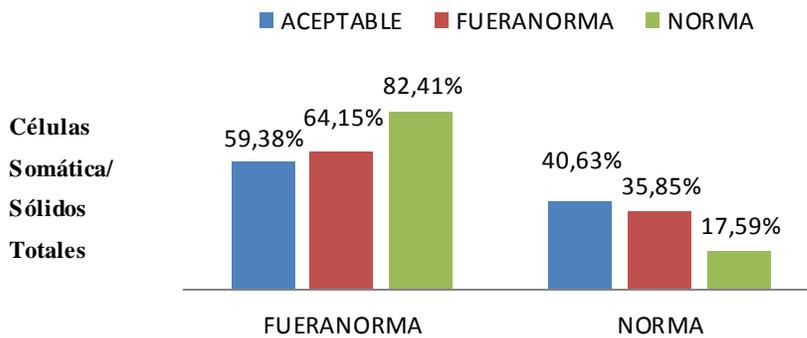






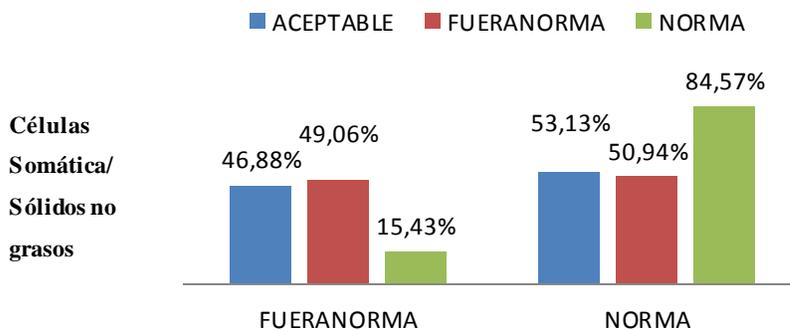
Da a notar que cuando el mayor porcentaje de muestras que están fuera de la norma en SCC, también se encuentran fuera de ella en contenido graso.

Grasa



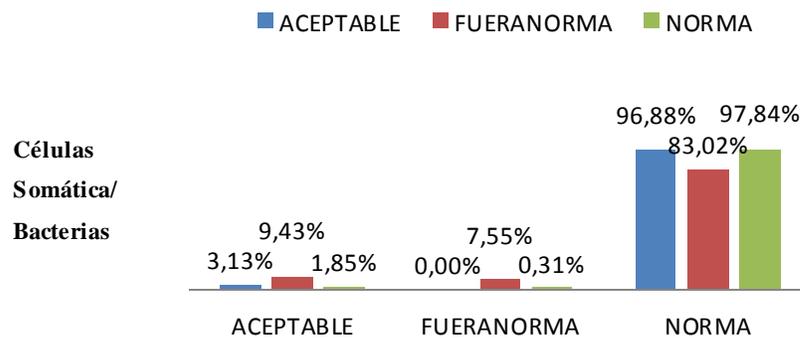
El mayor porcentaje de fuera de la norma en células somáticas, se encuentra también en sólidos totales.

Sólidos Totales



El mayor porcentaje de fuera de la norma en SCC, se encuentra dentro de la misma en sólidos no grasos.

Sólidos no grasos



La mayor cantidad de muestras se encuentran dentro de la norma en bacterias, manteniendo una relación con el mayor porcentaje de SCC que están dentro de la norma; al analizar el grupo fuera de norma de bacterias, el mayor porcentaje de altos SCC está también fuera de norma.

Bacterias

Tabla 3.7.- Resultados de las asociaciones estadísticamente significativas entre el parámetro grasa y las diferentes variables, Machachi-Ecuador 2013.

Variables	Análisis	Observaciones												
Grasa/ Producción	<p>■ FUERANORMA ■ NORMA</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Producción</th> <th>FUERANORMA</th> <th>NORMA</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>ALTA</td> <td>37,18%</td> <td>3,23%</td> </tr> <tr> <td>BAJA</td> <td>24,21%</td> <td>69,35%</td> </tr> <tr> <td>MEDIANA</td> <td>38,62%</td> <td>27,42%</td> </tr> </tbody> </table>	Producción	FUERANORMA	NORMA	ALTA	37,18%	3,23%	BAJA	24,21%	69,35%	MEDIANA	38,62%	27,42%	El mayor porcentaje de muestras fuera de norma en grasa se encuentra cuando la producción del animal es mediana.
	Producción	FUERANORMA	NORMA											
ALTA	37,18%	3,23%												
BAJA	24,21%	69,35%												
MEDIANA	38,62%	27,42%												
Grasa/ Suplemento	<p>■ FUERANORMA ■ NORMA</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Suplemento</th> <th>FUERANORMA</th> <th>NORMA</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Balanceado</td> <td>96,54%</td> <td>56,45%</td> </tr> <tr> <td>Natural</td> <td>3,46%</td> <td>43,55%</td> </tr> </tbody> </table>	Suplemento	FUERANORMA	NORMA	Balanceado	96,54%	56,45%	Natural	3,46%	43,55%	Se puede observar que la alimentación con balanceado está relacionada a que los porcentajes de grasa estén fuera de la norma.			
	Suplemento	FUERANORMA	NORMA											
Balanceado	96,54%	56,45%												
Natural	3,46%	43,55%												
Grasa/ Hacienda	<p>■ FUERANORMA ■ NORMA</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Hacienda</th> <th>FUERANORMA</th> <th>NORMA</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>GRANDE</td> <td>90,49%</td> <td>22,58%</td> </tr> <tr> <td>MEDIANA</td> <td>8,36%</td> <td>29,03%</td> </tr> <tr> <td>PEQUEÑA</td> <td>1,15%</td> <td>48,39%</td> </tr> </tbody> </table>	Hacienda	FUERANORMA	NORMA	GRANDE	90,49%	22,58%	MEDIANA	8,36%	29,03%	PEQUEÑA	1,15%	48,39%	En las haciendas grandes el mayor porcentaje de muestras se encuentran fuera de la norma en el contenido de grasa, mientras que en mediana y pequeñas tienden a estar dentro de la norma.
	Hacienda	FUERANORMA	NORMA											
GRANDE	90,49%	22,58%												
MEDIANA	8,36%	29,03%												
PEQUEÑA	1,15%	48,39%												

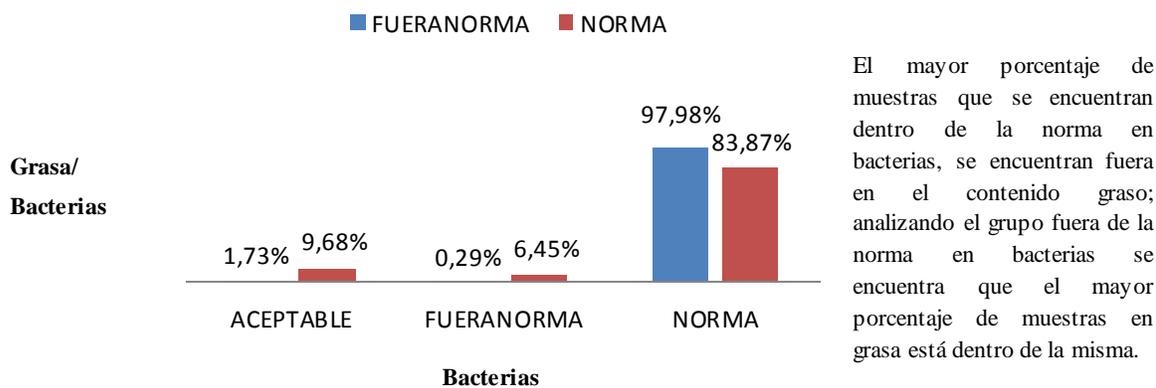
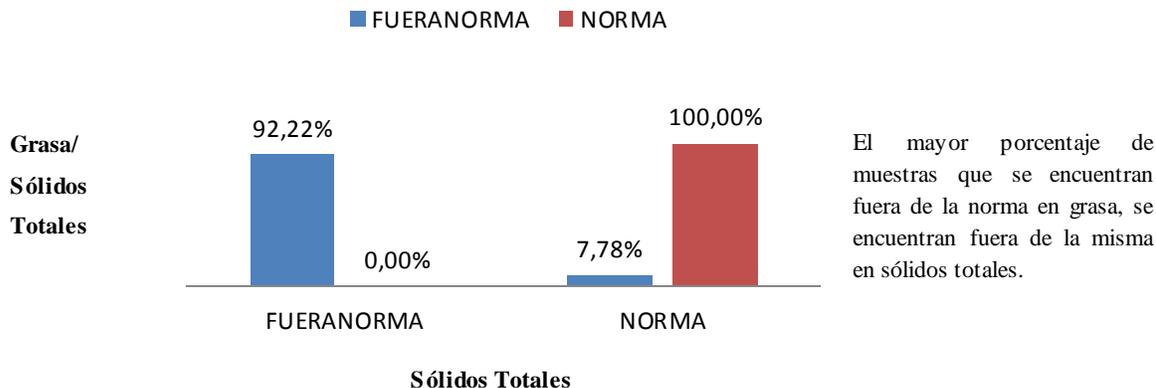
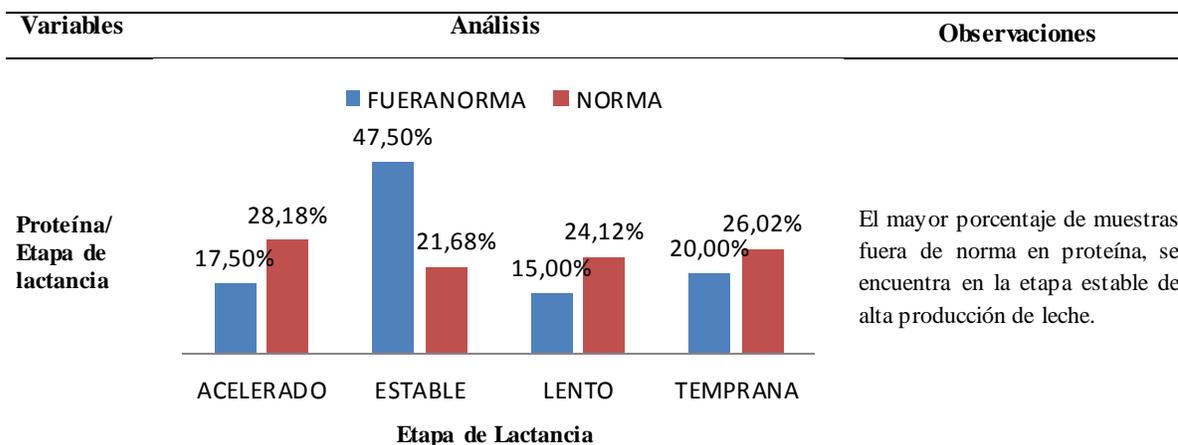
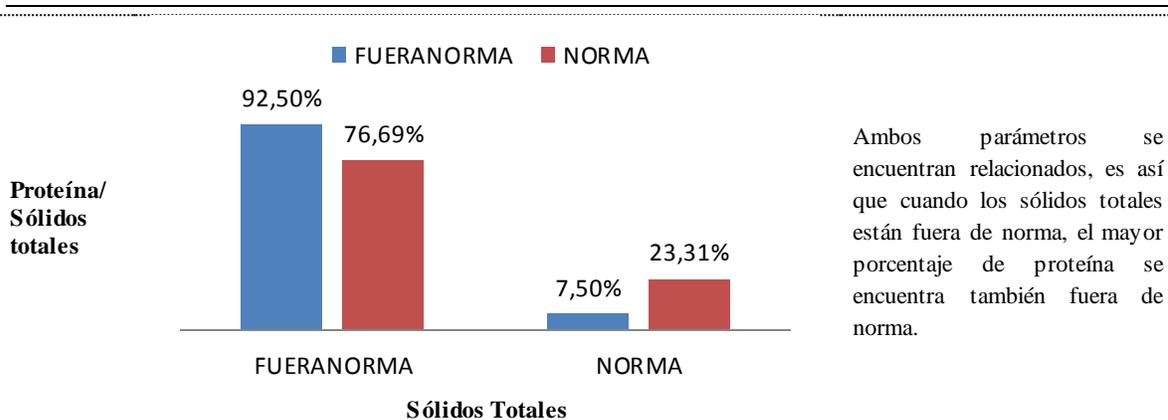
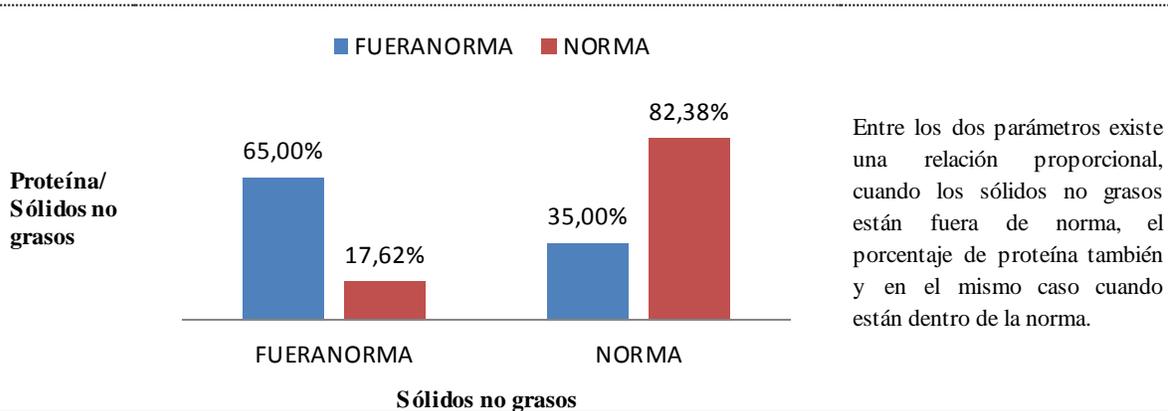


Tabla 3.8.- Resultados de las asociaciones estadísticamente significativas entre el parámetro proteína y las diferentes variables, Machachi-Ecuador 2013.



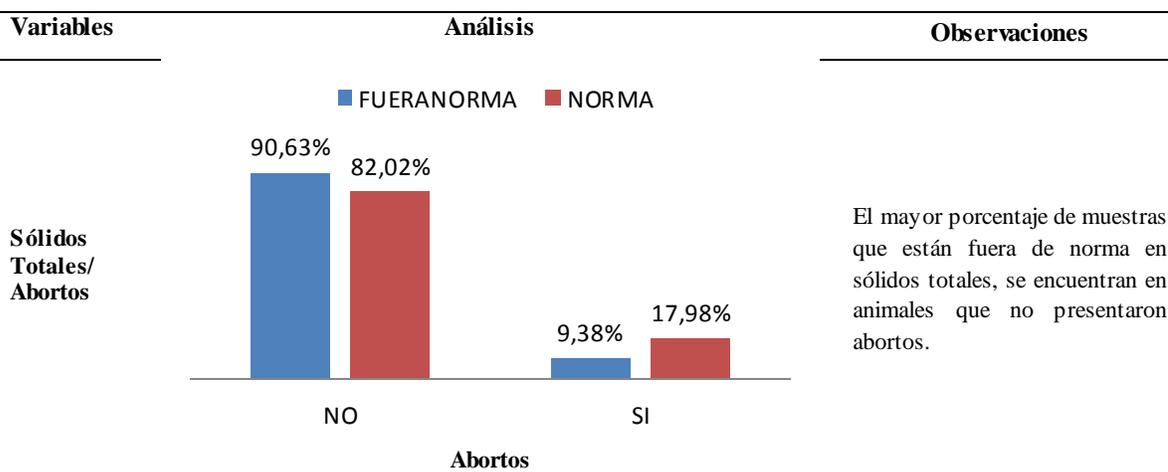


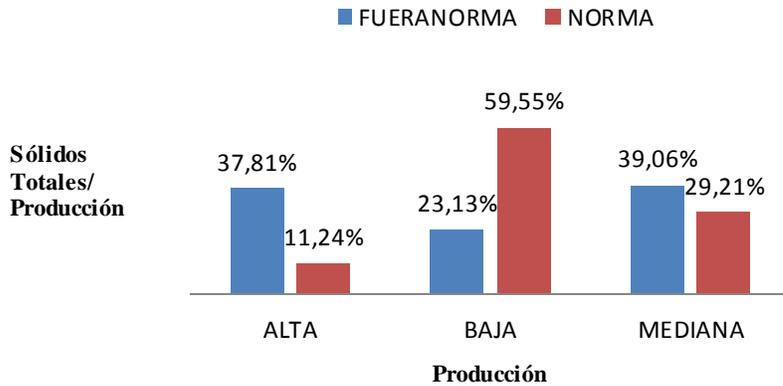
Ambos parámetros se encuentran relacionados, es así que cuando los sólidos totales están fuera de norma, el mayor porcentaje de proteína se encuentra también fuera de norma.



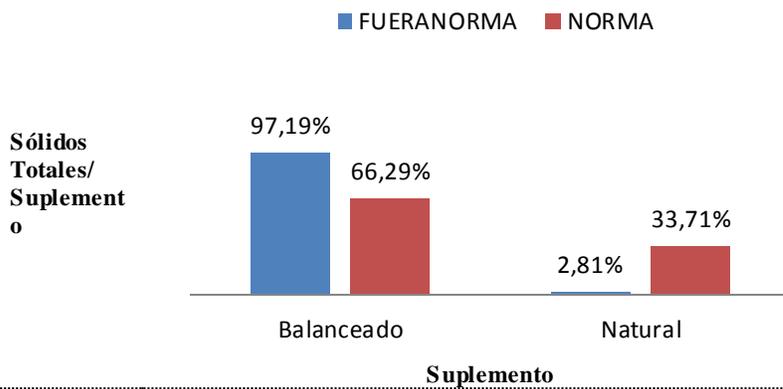
Entre los dos parámetros existe una relación proporcional, cuando los sólidos no grasos están fuera de norma, el porcentaje de proteína también y en el mismo caso cuando están dentro de la norma.

Tabla 3.9.- Resultados de las asociaciones estadísticamente significativas entre el parámetro sólidos totales y las diferentes variables, Machachi-Ecuador 2013.

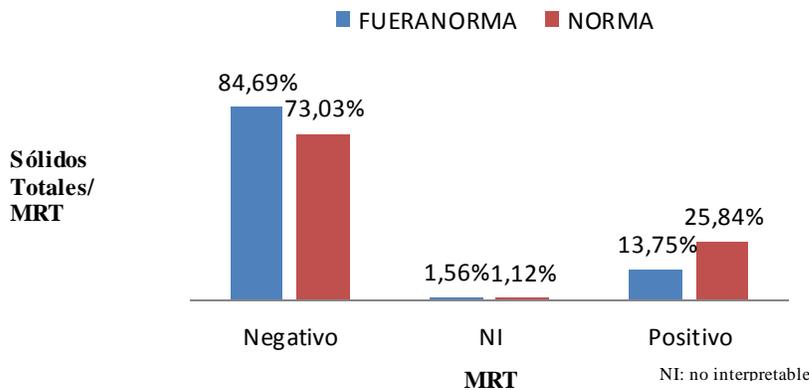




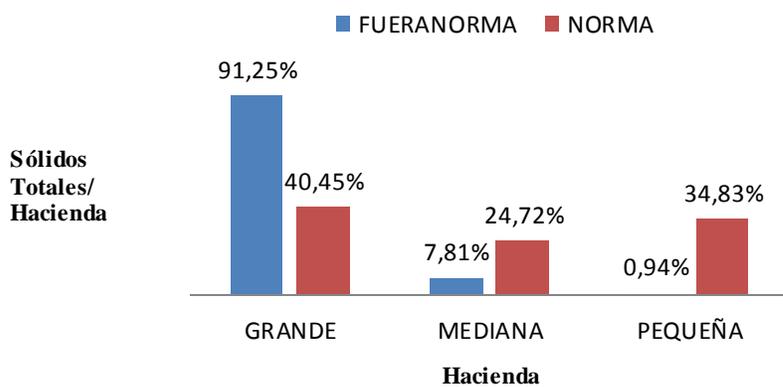
La concentración de sólidos totales es más baja cuando la producción de leche es mediana; mientras que en baja tienden a estar en mayor proporción dentro de la norma.



La influencia del balanceado marca una diferencia en el porcentaje de sólidos totales, dejándolos en mayor cantidad fuera de norma.



El mayor porcentaje de sólidos totales fuera de la norma se encuentran en los resultados negativos a MRT.



El mayor porcentaje de sólidos totales se encuentran fuera de norma en haciendas grandes, ocurriendo lo contrario en mediana y pequeñas.

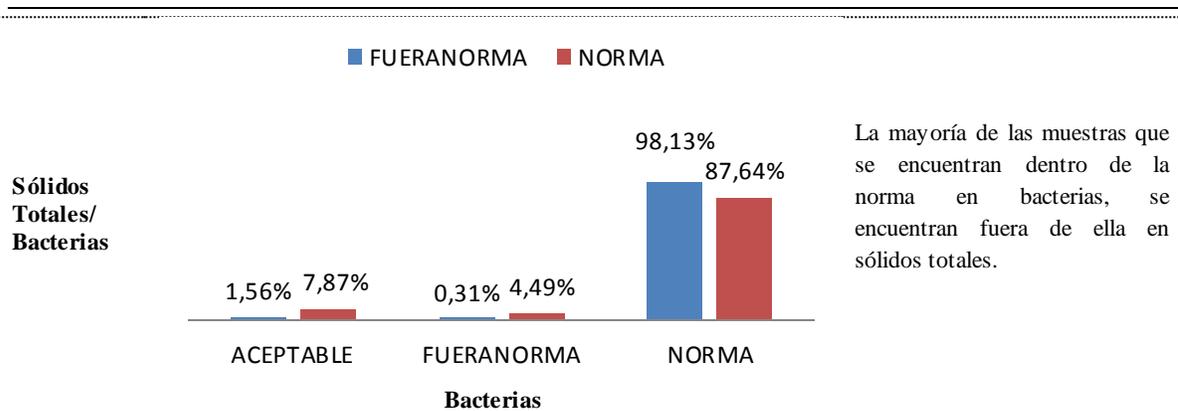
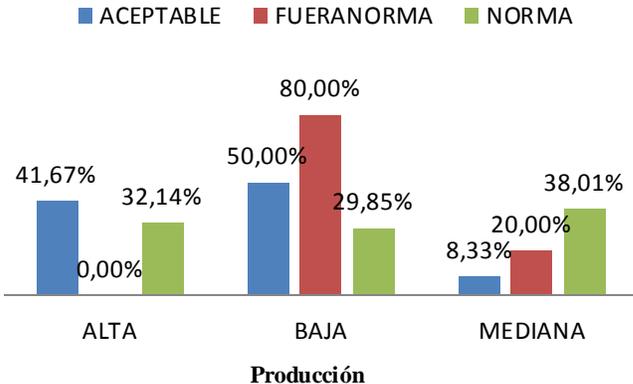
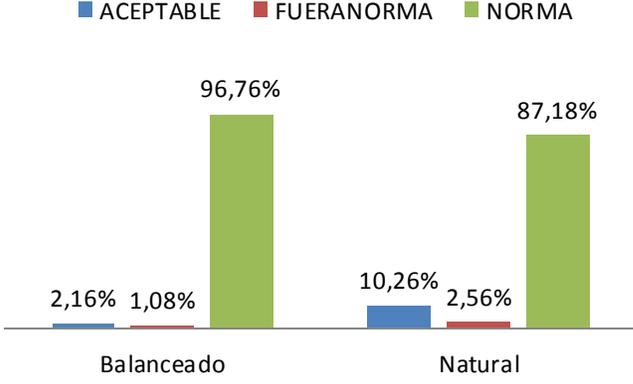
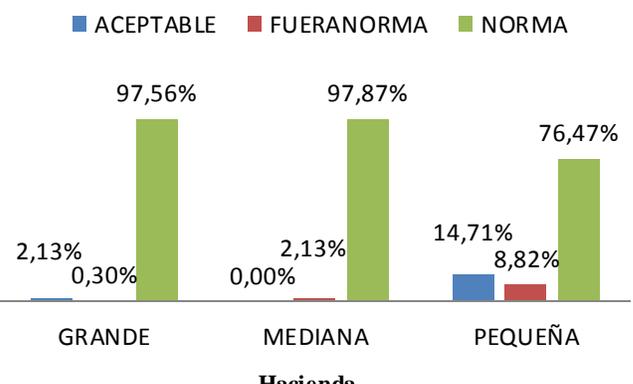


Tabla 3.10.- Resultados de las asociaciones estadísticamente significativas entre el parámetro sólidos no grasos y las diferentes variables, Machachi-Ecuador 2013.

Variables	Análisis	Observaciones												
Sólidos no grasos/Edad	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Edad</th> <th>FUERANORMA (%)</th> <th>NORMA (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>ADULTA</td> <td>90,11%</td> <td>80,50%</td> </tr> <tr> <td>JOVEN</td> <td>9,89%</td> <td>19,50%</td> </tr> </tbody> </table>	Edad	FUERANORMA (%)	NORMA (%)	ADULTA	90,11%	80,50%	JOVEN	9,89%	19,50%	El mayor porcentaje de sólidos no grasos se encuentran fuera de norma en la edad adulta de los animales.			
	Edad	FUERANORMA (%)	NORMA (%)											
ADULTA	90,11%	80,50%												
JOVEN	9,89%	19,50%												
Sólidos no grasos/Partos	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Partos</th> <th>FUERANORMA (%)</th> <th>NORMA (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>MEDIANOS</td> <td>30,09%</td> <td>69,91%</td> </tr> <tr> <td>MUCHOS</td> <td>25,00%</td> <td>75,00%</td> </tr> <tr> <td>POCOS</td> <td>13,23%</td> <td>86,77%</td> </tr> </tbody> </table>	Partos	FUERANORMA (%)	NORMA (%)	MEDIANOS	30,09%	69,91%	MUCHOS	25,00%	75,00%	POCOS	13,23%	86,77%	El mayor porcentaje de muestras que presentan sólidos totales fuera de norma, se encuentran cuando existen de 3 a 6 partos; mientras que a pocos partos la mayor cantidad porcentual se encuentra dentro de la norma en sólidos no grasos.
	Partos	FUERANORMA (%)	NORMA (%)											
	MEDIANOS	30,09%	69,91%											
MUCHOS	25,00%	75,00%												
POCOS	13,23%	86,77%												

Tabla 3.11.-Resultados de las asociaciones estadísticamente significativas entre el parámetro bacterias y las diferentes variables, Machachi-Ecuador 2013.

Variables	Análisis	Observaciones
Bacterias / Producción	 <p>■ ACCEPTABLE ■ FUERANORMA ■ NORMA</p> <p>80,00%</p> <p>41,67% 0,00% 32,14%</p> <p>50,00% 29,85%</p> <p>8,33% 20,00% 38,01%</p> <p>ALTA BAJA MEDIANA</p> <p>Producción</p>	El mayor porcentaje de muestras que tienen bacterias fuera de norma se presentan cuando la producción del animal es baja.
	Bacterias/ Suplemento	 <p>■ ACCEPTABLE ■ FUERANORMA ■ NORMA</p> <p>96,76%</p> <p>2,16% 1,08%</p> <p>10,26% 2,56%</p> <p>87,18%</p> <p>Balanceado Natural</p> <p>Suplemento</p>
Bacterias/ Hacienda		 <p>■ ACCEPTABLE ■ FUERANORMA ■ NORMA</p> <p>97,56%</p> <p>2,13% 0,30%</p> <p>0,00% 2,13%</p> <p>97,87%</p> <p>14,71% 8,82%</p> <p>76,47%</p> <p>GRANDE MEDIANA PEQUEÑA</p> <p>Hacienda</p>

Los resultados finales de cada parámetro, a nivel de haciendas grandes, medianas y pequeñas, se presentan en el anexo 11.

Análisis de Correspondencia Múltiple

Para determinar la múltiple asociación entre las variables, se realizó el gráfico de correspondencia, empleando el paquete FactoMineR, del programa R *versión 2.14.2*.

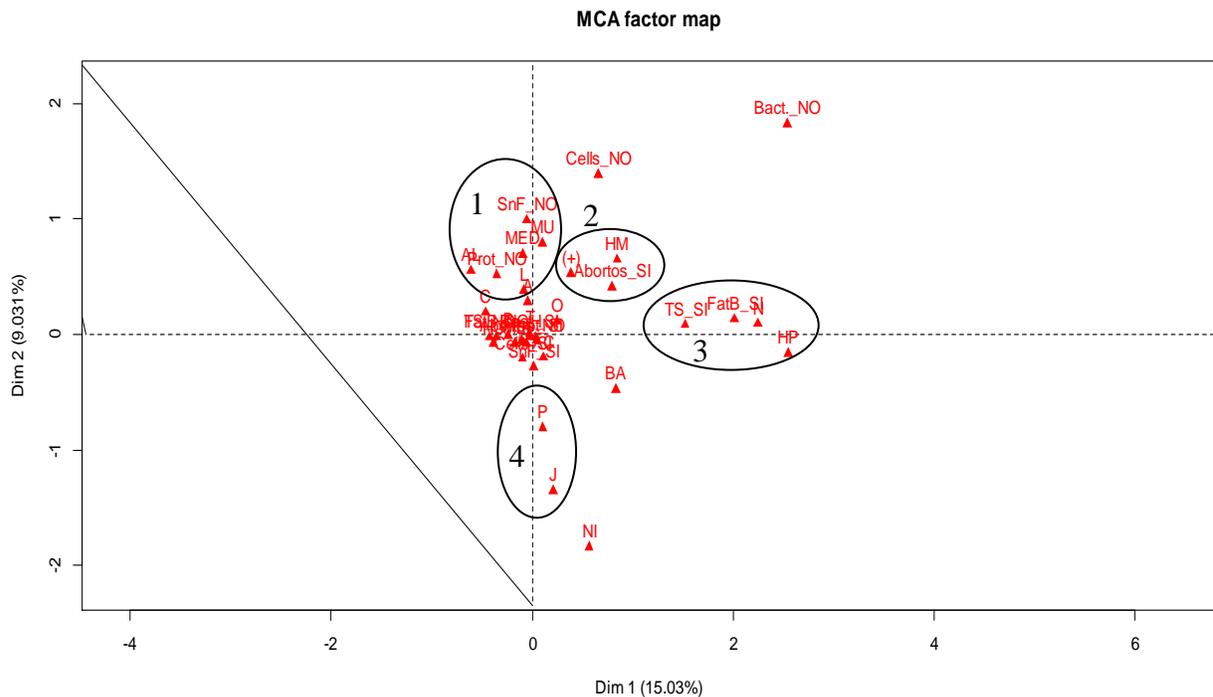


Figura 3.1.- Gráfico de correspondencia múltiple entre las variables de las muestras de las haciendas de Machachi-Ecuador 2013.

Como se observa en la Figura 3.1, existen cuatro grupos de variables que se asocian; 1. Sólidos no grasos que están fuera de la norma, grupos de partos que van de 3 en adelante, proteína que está fuera de la norma, alta producción de leche, edad adulta de los animales y la fase de descenso lento de lactancia; 2. Tamaño mediano de haciendas, con la presencia de abortos y resultado positivo a MRT; 3. Sólidos totales que están dentro de la norma, porcentaje de grasa dentro de la norma, suplemento alimenticio natural y tamaño pequeño de la hacienda; y 4. Pocos partos (0-2) y edad joven del animal.

Prevalencia de Brucelosis

La utilización de MRT (Milk Ring Test) en leche permitió identificar una prevalencia aparente (PA) de 16% (67/403) [IC_{95%} = 0.1319- 0.2070], seis muestras no fue

posible interpretar el resultado, demostrando que 67 bovinos muestreados presentaron inmunoglobulinas sensibilizadas al antígeno de *B. abortus*, patógeno causante de brucelosis en bovinos, los datos registrados de las muestras se pueden observar en el Anexo 12.

De las muestras positivas a MRT, se realizó en primer lugar el cultivo específico en medio Farrell, en el cual no se encontró crecimientos bacterianos referentes a *Brucella*; posteriormente se realizó la tipificación bacteriana en medios de cultivo para bacterias Gram negativas, encontrando dos especies claramente identificadas *E. coli* y *P. Vulgaris*; cuyos resultados se pueden observar en el Anexo 13.

Análisis de Factores determinantes para la calidad de la leche.

Para determinar las variables que representan factores influyentes se realizó la prueba de *Chi-cuadrado* (X^2) y el test exacto de *Fisher*, asociando los diferentes parámetros mediante tablas dinámicas empleando el paquete Rcmdr; para el *Odds ratio* se utilizó el análisis binomial, respecto a parámetro de menor incidencia, en el programa *R versión 2.15.3*, obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 3.12.- Resultados del análisis de los factores de riesgo de las haciendas de Machachi-Ecuador 2013.

Variables	Chi-Cuadrado		Fisher		
	valor <i>P</i>		valor <i>P</i>	<i>Odds ratio</i>	IC _{95%}
Edad / Células Somáticas					
Adultas / Jóvenes	10.16	0.001434	0.0003726	12.69	2.09-518.34
Partos / Células Somáticas					
Muchos/Pocos	14.92	0.0001125	0.01671	19.09	1.25-290.73
Medios/Pocos	19.74	8.86E-06	8.00E-06	4.81	2.22-11.59
Suplemento/Células Somáticas					
Natural/Balanceado	8.89	0.002875	0.009297	3.06	1.28-6.91
Tamaño Hacienda/Células Somáticas					
Mediana/Grande	4.14	0.04187	0.07064	2.28	0.89-5.40
Pequeña/Grande	8.19	0.004209	0.01407	3.08	1.22-7.24
Producción/Grasa					
Alta/Baja	46.81	7.81E-12	3.21E-13	32.67	8.13-288.17
Mediana/Baja	20.82	5.05E-06	7.90E-06	4.01	2.08-8.03
Suplemento/Grasa					
Balanceado/Natural	98.01	< 2.2e-16	2.83E-16	21.21	9.45-5099.44

Tamaño de Hacienda/Grasa					
Grande/Pequeña	216.97	< 2.2e-16	< 2.2e-16	181.97	54.93-798.93
Mediana/Pequeña	27.07	1.97E-07	1.22E-07	16.86	4.74-78.40
Etapas Lactancia/Proteína					
Estable/Lenta	7.16	0.007455	0.009435	3.50	1.26-11.26
Temprana/Lenta	0.14	0.7045	0.7861	1.23	0.36-4.49
Acelerada/Lenta	0	0.9978	1	1	0.28-3.74
Presencia Abortos/Sól. Totales					
NO/SI	5.16	0.02308	0.03516	2.11	1.02-4.26
Producción/Sól. Totales					
Alta/Baja	40.63	1.84E-10	1.08E-10	8.59	4.02-20.13
Mediana/Baja	20.38	6.36E-06	8.64E-06	3.43	1.92-6.23
Suplemento/Sól. Totales					
Balanceado/Natural	77.05	< 2.2e-16	7.56E-15	17.38	7.57-43.86
Tamaño Hacienda/Sól. Totales					
Grande/Pequeña	143.36	< 2.2e-16	< 2.2e-16	92.59	27.11-492.69
Mediana/Pequeña	22.52	2.08E-06	1.51E-06	15.60	3.99-91.55
Edad/Sól. No grasos					
Adulta/Joven	4.55	0.03289	0.04035	2.20	1.03-5.27
Partos/Sól. No grasos					
Medios/Pocos	16.59	4.64E-05	4.29E-05	2.82	1.65-4.92
Muchos/Pocos	0.47	0.495	0.4422	2.18	0.04-28.33
Producción/Bacterias					
Baja/Alta	4.19	0.04064	0.0573	∞	0.69-∞
Mediana/Alta	0.87	0.3508	1	∞	0.02-∞
Suplemento/Bacterias					
Natural/Balanceado	0.64	0.4228	0.3957	2.40	0.05-25.06
Tamaño Hacienda/Bacterias					
Mediana/Grande	2.89	0.08885	0.2186	7.71	0.09-609.64
Pequeña/Grande	18.15	2.04E-05	0.003863	27.47	2.14-1460.77

∞, Infinito.

De la Tabla 3.12 se puede identificar que la mayoría de asociaciones son estadísticamente significativas e influyen en los parámetros de calidad de la leche; dando a notar gracias al valor del *odds ratio* la probabilidad de encontrar la influencia de una variable sobre la otra, aunque cabe recalcar que la producción de leche no es un parámetro significativo para la alta presencia de bacterias.

CAPITULO 4: DISCUSIÓN

4.1 Células somáticas

Los análisis de células somáticas se han realizado tomando la muestra de cada uno de los cuartos mamarios (1 251 000 cel./mL), de la mezcla entre ellos (679 000 cel./mL) y del tanque de enfriamiento, encontrando que el incremento del conteo durante una IMI es menor a nivel de ubres, por el efecto de la dilución; ya que generalmente una glándula mamaria es considerada infectada con que solo uno de los cuartos esté afectado (Timms *et al.*, 1986).

Debido a que en cada país la normativa varía y a criterios dispersos para establecer un rango adecuado, se han presentado datos como SCC < 400 000 cel./mL para productos de buena calidad (Jánosi & Baltay, 2004) y para muestras asociadas con mastitis bovina mayores a 500 000 cel./mL (Fell *et al.*, 2003); mientras que varias investigaciones con conteos <100 000 cel./mL definen que los animales se encuentran sanos y con leche de mejores características (Pavel & Gavan, 2011; Bytyqi *et al.*, 2010; Hamann, 2002), y a valores superiores pueden presentar IMI, mastitis subclínica o clínica, ya que las infecciones bacterianas hacen que estos valores asciendan hasta 1 000 000 cel./mL (Bytyqi *et al.*, 2010); recalando en el presente estudio que el 20.78% podrían tener algún tipo de afección, lo que implica que se debería redefinir los parámetros de calidad del país, ya que se encontró un mínimo de 4 000 cel./mL y máximos de 14 330 000 cel./mL, dato más elevado (5 385 000 cel./mL), que los reportados por Savadogo *et al.* (2004), de bovinos que presentaban problemas de higiene y salud, dando a notar que nuestros valores son casi tres veces mayores; aunque la media calculada está dentro de lo establecido (<700 000 cel./mL), con 494 300 cel./mL, similar al promedio de Eslovenia de 499 200 cel./mL (Rajčević *et al.*, 2003), mientras que en el UK se ha demostrado que mayor o igual a 200 000 cel./mL son susceptibles a presentar infecciones intramamarias (Dohoo & Meek, 1982).

Un criterio predominante para determinar la calidad de la leche se basa en el conocimiento de los factores que permiten la variación del conteo celular (Pavel & Gavan,

2011), ya que existe una fuerte relación entre el SCC y la composición de la leche, lo que explica que altos valores pueden influir sobre otros parámetros (Quédraogo *et al.* 2008). El porcentaje que sale fuera de la norma (53/409), está influenciado estadísticamente por la edad adulta de los animales (98.11%), debido a la presencia de más infecciones (Reichmuth, 1975), y a pesar que los bovinos estén libres de mastitis clínica, el parámetro aumenta con los años y partos (Pavel & Gavan, 2011; Skrzypek *et al.*, 2004), encontrándose que a la presencia de 7 o más, está fuera de la normativa en SCC, incrementando el riesgo de presentar mastitis clínica (Green *et al.*, 2002; Whist *et al.*, 2006), posiblemente debido a que a lo largo del tiempo se produce un problema en las defensas naturales del pezón o por una disminución sistemática de la capacidad inmune (Paganelli *et al.*, 2006), representando un gran problema, ya que el flujo elevado de células en la leche no sólo daña el epitelio mamario sino que también disminuye la calidad (Singh & Dang, 2002). Aunque la raza no resultó significativa, el 88.26% fueron Holstein y por razones genéticas el conteo es más bajo antes de los dos partos (Monardes & Hayes, 1985).

Otro factor que aumenta este parámetro es la alimentación diaria natural y principalmente en haciendas pequeñas (26.47%), que es donde se utiliza este tipo de dieta, ya que en predios donde el SCC es alto, los ordeñadores no examinan las ubres de los animales y poseen poco conocimiento de las prácticas de higiene y calidad (Dang y Anand, 2007); probablemente por la manipulación humana en estas haciendas; sin embargo en sistemas de ordeño automático el conteo de células es más alto que en otros sistemas, por los procedimientos de limpieza usados en el equipo (Klungel *et al.*, 2000).

Aunque en muchos estudios se ha demostrado la correlación entre SCC y otros parámetros como la producción lechera (Rajčević *et al.*, 2003), y el ciclo de lactancia (Sharma *et al.*, 2011; Rainard & Riollet, 2006; Burvenich *et al.*, 2003), en éste no fueron representativos; mientras que los factores que influyen este parámetro en la calidad de la leche son: a) [edad adulta] / [joven] $OD=12.69$; b) [muchos] y [medios] / [pocos partos] $OD=19.1$ y 4.8 , respectivamente; aunque en otros reportes la probabilidad cambió ($SCC > 199\ 000$ cel./mL o más, $odds\ ratio = 7.12$) (Breen *et al.*, 2009); c) [suplemento natural] / [balanceado] $OD=3.1$; y d) [haciendas mediana] y [pequeña] / [grande] $OD=2.3$ y 3.1 , respectivamente.

Se han realizado estudios para factores determinantes en la presencia de mastitis clínica bovina, causada por dos patógenos *E. coli* y *S. aureus*, han sido el tratamiento de desinfección, procesos de limpieza, raza del animal, porcentaje de vacas de baja producción y producción lechera, ordeño mecánico, fuentes de agua, condiciones del establo, respectivamente; en donde el tanque de enfriamiento tuvo un $SCC < 150\ 000$ cel./mL, (Schukken *et al.*, 1990).

4.2 Grasa

El porcentaje de grasa se encontró entre 0.26-10.33%, cuya media está por debajo de la normativa (1.781%, $CV=76.7\%$), a diferencia de otros estudios donde el rango va desde 3.82-5.12% en bovinos lecheros, analizados bajo diferentes sistemas de ordeño en la India (Dang y Anand, 2007), y con diferentes estaciones del año, un promedio de 4.16%, CV de 18.75% (Rajčević *et al.*, 2003).

El bajo contenido de grasa (84.84%), se relaciona cuando la producción de los animales es de 19-27 L/día (38.62%), en haciendas grandes (90.49%) y con una alimentación enriquecida con balanceado (96.54%), que por lo general se da en estas haciendas, tomando en cuenta que éste es un parámetro muy sensible a los cambios en la dieta (Pavel & Gavan, 2011), ya que tanto la composición como el manejo nutricional en los bovinos son los responsables de los cambios en el contenido de grasa y proteína en la leche (Álvarez *et al.*, 2009), siendo los principales factores, a) la fibra (Barbosa *et al.*, 2013), encontrada en el forraje, esencial para el funcionamiento normal del rumen de la vaca y cuyo bajo nivel, deprime la formación de acetato, lo que a su vez resulta en una reducción de la proporción de lípido en la leche (2 a 2.5%) (Smith, 1962); y b) el porcentaje de proteína suministrada (Barbosa *et al.*, 2013), proporcionada por el balanceado, alto en energía y/o proteínas. Ambos factores suministran el nivel nutricional adecuado para los bovinos lecheros de alta producción (Castro, 1984).

Los factores influyentes en el porcentaje de grasa dentro de la calidad de la leche son: a) la [ausencia de abortos] / [presencia] $OD=2.2$; b) la [producción de leche alta] y [mediana] / [baja] $OD=32.7$ y 4, respectivamente; c) la alimentación basada en

[balanceado] / [natural] $OD=21.2$; y d) [haciendas grandes] y [medianas] / [pequeñas] $OD=182$ y 16.9 , respectivamente.

4.3 Proteína

Presentó una media de 3.31%, la cual está sobre el rango establecido en el país, con un mínimo de 1.52% y un máximo de 4.92%, similar a los datos obtenidos bajo algunos sistemas de ordeño, que van de 3.02-3.99% (Dang y Anand, 2007) y la influencia de diferentes condiciones climáticas, 3.41%, $CV=12.02\%$ (Rajčević *et al.*, 2003), similar a este estudio ($CV=11.35\%$). Cannon (2003) demostró que el animal con menos de 2.8% o más de 3.5% de proteína tiene menor probabilidad de una inseminación exitosa, debido a que cuando existe alto contenido, los cuartos se encuentran infectados (Forsbäck *et al.*, 2010).

El porcentaje de proteína que sale fuera de norma, es decir que posee bajas cantidades, es el 90.22%, y se presenta cuando los bovinos se encuentran en la etapa estable (47.50%) por lo que constituye un factor de riesgo en la calidad de la leche; así la [fase estable de alta producción] y [temprana] / [fase de descenso lento] un $OD=3.5$ y 1.2 , respectivamente, ya que la composición de la leche de bovinos varía durante la lactancia y se caracteriza por un incremento proporcional de sus componentes, mientras que la producción disminuye, ya que tiene correspondencia con la disponibilidad de nutrientes y la genética del animal, sin embargo las tasas de producción más altas se encuentran entre la tercera y sexta lactancia, y se reduce sustancialmente a partir de los 8 años, dependiendo del inicio de su edad fértil (Álvarez *et al.*, 2009). Además, posiblemente debido a la asociación con las células somáticas, que en etapas tempranas y tardías de lactancia, como respuesta de la inmunidad innata del animal, se incrementan como mecanismo de defensa de la glándula mamaria al tiempo de parto (Sharma *et al.*, 2011).

4.4 Sólidos totales

La media es de 10.41%, la cual se encuentra fuera de la norma, con un mínimo de 4.61% y un máximo de 18.34%; a pesar del efecto negativo de las infecciones intramamarias en la composición de la leche, el promedio es de 12.15%, de todas las

muestras tanto infectadas como no infectadas (Barbosa *et al.*, 2013), datos adecuados para lo establecido en el Ecuador.

Dentro del parámetro sólidos totales se encuentran las grasas, proteínas, carbohidratos y minerales, y según este estudio el 78.24% de las muestras salen de los parámetros permitidos cuando los animales no han presentado abortos (90.63%), conjuntamente con una producción entre los 19-27 L/día (39.06%), con el consumo de balanceado (97.19%), y en haciendas grandes (90.25%). Los factores determinantes para los ST son: a) [ausencia de abortos] / [presencia] $OD=2.11$; b) [producción de leche alta] y [mediana] / [baja] $OD=8.6$ y 3.4 , respectivamente; debido a que los períodos de preñez en los bovinos se encuentran regulados por los niveles de hormonas producidas por los estímulos recibidos y llevados al sistema nervioso, siendo las principales la progesterona y la prolactina (Hill y Wyse, 2006; Alvarez *et al.*, 2009), la primera reduce la síntesis de leche mediante la inhibición de la prolactina, pero disminuye parcialmente antes del parto y en mayor cantidad después del mismo, con la salida de la placenta; mientras que la concentración de prolactina aumenta aproximadamente 24 horas antes del parto y se afecta por el período de lactancia, siendo más elevada alrededor de la octava semana, momento en que la producción es máxima. Estos procesos hormonales y principalmente la prolactina produce cambios en la cantidad de sólidos totales, pues disminuye los niveles de Sodio y Cloro, aumenta la síntesis de proteína, lactosa y la secreción de grasas, además existen cambios en el de transporte de inmunoglobulinas y otras proteínas no sintetizadas en la glándula (Tamime, 2009); c) [balanceado] / [natural] $OD=17.4$; y d) [haciendas grandes] y [medianas] / [pequeñas] $OD=92.6$ y 15.5 , respectivamente, ya que una buena alimentación en las primeras etapas de lactancia permite que exista niveles adecuados de grasa y proteínas, porque los alimentos proveen al animal la energía para los procesos internos (Tamime, 2009), es así que la fibra mantiene principalmente los contenidos de grasa, mientras que mayor y mejor alimentación mantienen los niveles de proteína, porque existe alta ingesta de energía, consumida por las bacterias del rumen para producirla (Tamime, 2009).

Además, el contenido de sólidos totales se encuentra influenciado por el inicio de la lactancia, ya que aumenta el metabolismo de las glándulas mamarias, paralelamente las

enzimas aceleran los procesos de síntesis y la circulación sanguínea se dirige a la ubre para proporcionar los compuestos necesarios para la síntesis de leche (Urroz, 1991; Alvarez *et al.*, 2009), es así que aproximadamente el 50% de los nutrientes se derivan de los constituyentes del alimento como los ácidos grasos de cadena larga, mientras que el resto son sintetizados por la glándula en las células alveolares (Hill y Wyse, 2006; Alvarez *et al.*, 2009) como proteínas, grasas de cadena corta y lactosa, y otros transportados desde el plasma sanguíneo directamente como las sales, inmunoglobulinas, agua y vitaminas (Smith, 1962). Las células alveolares que se van perdiendo durante la lactancia no vuelven a reemplazarse en la misma, por lo que influyen en la producción de leche; a éstas llegan los precursores de la sangre y nutrientes para transformarlos en componentes lácteos y descargar la leche (Alvarez *et al.*, 2009), con la cantidad de ST determinados por los procesos fisiológicos por los que pasa el animal.

Algunos resultados se pudieron observar elevados, posiblemente por el tiempo desde el último parto, ya que el calostro se acumula el momento del mismo y contiene gran cantidad de proteínas, grasas, minerales, vitaminas e inmunoglobulinas para la protección inmunológica de la cría, estos niveles se reducen rápidamente con el avance de las etapas de lactancia (Urroz, 1991; Tamime, 2009; Alvarez *et al.*, 2009), porque la permeabilidad de las células secretoras para las inmunoglobulinas es alta durante la síntesis de calostro, pero decrece rápidamente con el comienzo de la lactancia (Hill y Wyse, 2006).

4.5 Sólidos no grasos

Presentan un promedio de 8.55% en un rango de 4.03-9.97%, que están dentro de la normativa del país; dato menor a los resultados influenciados por el efecto de las infecciones intramamarias en la composición de la leche, de 9.13% (Barbosa *et al.*, 2013).

Los sólidos no grasos (22.25%) tienden a salirse de la norma a edad adulta (90.11%) con la presencia de 3 a 6 partos (30.09%), siendo éstos los factores influyentes en la calidad de la leche con un $OD=2.2$ en la [edad adulta] / [joven]; y $OD=2.8$ y 2.1 para [medios] y [muchos] / [pocos partos], respectivamente.

4.6 Bacterias

La contaminación bacteriana de la leche hace el producto no apto para el consumo humano, además permite la diseminación de algunas enfermedades como la brucelosis (Sharma *et al.*, 2011); en el estudio se encontró un promedio de 135 400 UFC/mL, lo que cumple con la normativa, un mínimo de 140 UFC/mL y un máximo de 35 720 000 UFC/mL; probablemente debido al estado de salud de los animales y a la higiene de los procesos de ordeño.

El 1.22% de las muestras presentan altas cantidades de bacterias, relacionándose a producciones bajas (80%), con el consumo de alimentos naturales y en haciendas pequeñas (8.82%). Aunque en este estudio no hubo una asociación significativa entre bacterias y la edad de los bovinos, según Burvenich *et al.* (2003), los animales adultos presentan mayor UFC provocada por coliformes.

En el análisis de los factores determinantes, encontramos el suplemento [natural] / [balanceado] $OD=2.4$ y las [haciendas medianas] y [pequeñas] / [grandes] $OD=7.7$ y 27.5 , respectivamente, ya que la dieta diaria puede constituir un peligro para los contaminantes microbianos en la leche cruda, ya que sirve de vehículo de transmisión de agentes patógenos causantes de infección en el ganado, además es una fuente importante de esporas, lo que hace que el contenido microbiano aumente, por ende para la defensa del animal, el nivel de células somáticas; siendo patógenos asociados con el alimento *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* entérica, que producen varios niveles de cambios en leche (Tamime, 2009), además existen bacterias psicrotróficas (especies de *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Lactobacillus*) que producen proteasas y lipasas termoestables, lo que altera la composición de la leche (Barbano *et al.*, 2006).

Además Estudios de Elmoslemany *et al.*, (2009b) demostraron que la calidad bacteriológica del tanque de enfriamiento está influenciada por la alta alcalinidad del agua ($OD=12$) y los malos tratamientos de limpieza ($OD=5.3$) asociándose con alta cantidad de bacterias; mientras que los bajos conteos estuvieron influenciados con alta temperatura de los detergentes ($OD=0.87$) y uso de aguas suaves ($OD=0.11$), recalando la gran

importancia de la higiene de las ubres y el proceso de lavado de los sistemas de ordeño en las cualidades de la leche del tanque.

4.7 Análisis de las variables

Muchos de los cambios en la composición debido a altos SCC, ocurren por el daño de las células epiteliales, por una disminución de la síntesis, incremento en la permeabilidad vascular con el paso de inmunoglobulinas, proteínas del suero, minerales como sodio y cloro, y un incremento en la actividad proteolítica (Sharif *et al.*, 2008; Le Roux *et al.*, 2003; Schultz, 1977).

La medición sólo de las células somáticas no es un indicador suficiente de mastitis, por lo que para su diagnóstico satisfactorio es necesaria una evaluación combinada con el contenido bacteriológico (Jánosi & Baltay, 2004), aunque se ha publicado que un valor alto de SCC es el criterio para definir el estado de salud de la ubres (Holdaway, 1990). En este estudio se obtuvo que las células se encuentran directamente relacionadas con los sólidos no grasos, en contradicción con lo reportado por Barbosa *et al.* (2013), según lo cual existe un efecto negativo, ya que cuando aumenta 100 000 cél/mL, los SNF disminuyen en un 0.02%.

El conteo de células somáticas está inversamente relacionado con: a) el porcentaje de lípidos, algunas investigaciones han reportado que altos SCC presentan bajos contenidos de grasa y proteína (Sharma *et al.*, 2011; Juozaitiene *et al.*, 2006; Hamann, 2002; Klinkon *et al.*, 2000), mientras que Horlet & Seegers, (1998) calculan que por cada dos veces que aumentan las células, la composición de la leche varía con una disminución de 0.20 g/kg y un incremento de 0.15g/kg, respectivamente, debido a la habilidad de los PMN de degradar los glóbulos de grasa (Sharma *et al.*, 2011); Quédraogo *et al.* (2008), presentó los dos parámetros altos, en bovinos de raza Zebu; b) los sólidos totales, sin embargo se ha demostrado que aumentan proporcionalmente con SCC (Barbosa *et al.*, 2013), y c) el contenido microbiano, que en conjunto determinan el nivel de enzimas termo-resistentes en la leche, ya que las bacterias psicrotróficas contribuyen a la cantidad de proteasas y lipasas que son estables a la temperatura por lo que se mantienen después de la pasteurización (Barbano *et al.*, 2006); aunque siempre se comparan estos dos parámetros, no siempre

concuerdan (Pyörälä, 2003); en este estudio se correlacionan inversamente, siendo no relevante si es más o menos patógena, se diferencian en cuanto elevan el contenido de células somáticas (Djabri *et al.*, 2002); sin embargo valores elevados de éste parámetro no son significativos si al momento de la examinación no existe gran cantidad de bacterias, pero su valor absoluto permite determinar la salud del animal (Jánosi & Baltay, 2004), además Rivas *et al.* (2001), bajo inoculación bacteriana encontró también que no existe relación, similar a otros autores que han reportado que a un incremento de SCC no existen microorganismo (Miller *et al.*, 1983).

El porcentaje de grasa es proporcional a los sólidos totales e inverso a las bacterias; las proteínas se relacionan linealmente a los ST y los sólidos no grasos, finalmente los sólidos totales a las bacterias, sin embargo se ha demostrado que las IMI causadas por todos los patógenos estudiados reducen los ST en leche (Barbosa *et al.*, 2013). Además se encontró que el contenido de grasa es alto, cuando la proteína y los sólidos totales también (Pavel & Gavan, 2011).

Cuando MRT resultó negativo, tanto SCC (66.04%) como los ST (84.69%) se presentan fuera de la norma; debido a que la prueba identifica células del sistema inmunitario (IgA, IgG) sensibilizadas al antígeno de *Brucella* spp.

Existen grupos de variables que presentan mayor asociación entre sí, como se observa en la Figura 3.1 del apartado resultados, probablemente a que los animales a edades adultas presentan mayor números de partos, además generalmente en la zona la alimentación natural es común en haciendas medianas y pequeñas, y algunos de los parámetros debido a estas variables están fuera o dentro de la norma, como ya se mencionó; los parámetros de calidad presentan asociaciones estadísticamente significativas permitiendo observar que el grupo 1. hace referencia a leche de mala calidad, mientras que el grupo 3. leche de buena calidad.

4.8 Tanques de enfriamiento

Presentaron un promedio de SCC= 449 000 cel./mL, que está dentro de la normativa y un 16.67% fuera de ella, teniendo un valor máximo de 1 582 000 cel./mL, mayor a los resultados encontrados (máximo= 400 000 cel./mL) por Barkema *et al.*, (1998),

en los cuales determinaron que la varianza de la incidencia de mastitis clínica en el rebaño incrementa cuando disminuye el SCC en el tanque; tomando en cuenta que éste parámetro es mayor a 200 000 cél/mL debido a altos conteos de células somáticas de un número menor de animales dentro del rebaño (Barbano *et al.*, 2006). Además se calculó un porcentaje medio de grasa de 3%, proteína 3%, sólidos totales 12%, sólidos no grasos 8.47% y bacterias 38 266 UFC/mL, encontrándose todos estos parámetros dentro de la normativa del país.

La metodología utilizada para la determinación de los parámetros físico-químicos y microbiológicos para la calidad de la leche, mediante los equipos Fossomatic FC, MilkoScan FT+ y BactoScan FC ha sido rápida, y eficiente debido a su alta especificidad y sensibilidad, 83 y 100%, respectivamente (Jánosi & Baltay, 2003); aunque el costo aún es muy elevado.

4.9 Prevalencia de Brucelosis

Se ha encontrado prevalencias variadas de brucelosis, determinadas a través de diferentes pruebas diagnósticas, entre las cuales mediante cultivo en el Cantón Mejía, el 15% (9/60) (Olmedo, 2010); según MRT realizado en las provincias Carchi/Imbabura/Sucumbios el 16.48% (15/91) (Ibarra, 2008); mientras que en este estudio también por esta prueba se determinó, 16.62% (67/403); la comparación con el primer estudio a pesar de que se realizaron en la misma zona, no es posible debido a diferencias en la metodología empleada; sin embargo, en el segundo, 15 muestras positivas a MRT fueron comprobadas con otras pruebas como Rosa de Bengala, SAT-EDTA, miELISA, 12 de las cuales fueron positivas en todos los diagnósticos; para confirmar la presencia de *Brucella* spp., se realizó cultivo específico Farrell, en el cual ninguna de las muestras tuvo crecimiento, debido a que los animales no estaba excretando el patógeno en leche; lo que sugiere que el MRT da falsos resultados debido a que las muestras son recogidas poco después del parto o en las últimas etapas de lactancia, son calostro o pertenecen a bovinos con mastitis y por el factor de dilución de la muestra (Rivera *et al.*, 2003), es por ello que esta metodología es poco usada en la determinación a nivel individual, por la baja especificidad que presenta (Cadmus *et al.*, 2008), aunque se haya calculado una sensibilidad y especificidad de 46.11% y 94.92%, respectivamente (Ibarra, 2008), que

demuestran que la prevalencia real puede incrementarse y que no es muy sensible cuando la leche presenta bajas concentraciones de inmunoglobulinas A y M o que posee bajas o excesivas concentraciones de grasa (Patterson *et al.*, 1976).

Del cultivo de las muestras positivas a MRT solo se pudo aislar *E. coli* y *P. vulgaris*, a pesar que la prueba es rápida y de bajo costo (Cadmus *et al.*, 2008), presenta muchas reacciones cruzadas que han sido demostradas mediante aglutinación, fijación del complemento y inmunodifusión, con *Pasteurella multocida*, *Campilobacter*, *Salmonella urbana*, *Yersinia enterolítica* y *E. coli*, (Chukwu, 1987; Emmerzaal *et al.*, 2002); además se ha encontrado que la mastitis clínica causada por bacterias Gram-negativas como *E. coli*, *Klebsiella* spp. o *Pseudomonas* spp., ocurre con mayor frecuencia en rebaños con un conteo de células somáticas bajo en el tanque de enfriamiento (Barkema *et al.*, 2006), siendo el primero uno de los patógenos más aislados de leche bovina (Breen *et al.*, 2009).

CAPITULO 5: CONCLUSIONES

- Al usar citometría de flujo y análisis por infrarrojo se pudo evaluar los parámetros de calidad de la leche, de los resultados se observa que dentro de la Norma INEN se encuentran el 87.04% SCC, 15.16% grasa, 90.22% proteína, 21.76% sólidos totales, 77.75% sólidos no grasos y 98.77% bacterias.

- Al realizar las pruebas en las muestras de los tanques de enfriamiento se encontró dentro de la Norma INEN el 83.34% SCC, 83.33% grasas, 91.67% proteína, sólidos totales, sólidos no grasos y 100% bacterias.

- El uso del MRT permitió calcular una prevalencia aparente de 16.62% (67/403), que no se pudo confirmar mediante aislamiento, solo se identificó mediante pruebas bioquímicas *E. coli* y *P. vulgaris*.

- Los factores de riesgo que influyen en la calidad de la leche sobre los parámetros: a) células somáticas: edad, el número de partos, suplemento y tamaño de la hacienda; b) porcentaje de grasa: producción, suplemento y tamaño de la hacienda; c) proteína: etapa de lactancia; d) sólidos totales: presencia de abortos, producción, suplemento y tamaño de la hacienda; e) sólidos no grasos: edad y número de partos y finalmente f) bacterias: suplemento y tamaño de hacienda.

- Mediante el análisis de correspondencia múltiple se encontró cuatro grupos de variables que presentaron mayor asociación entre ellas, lo que permite observar factores que pueden manipularse que se van a presentar juntos, determinando la calidad de la leche.

CAPITULO 6: RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio en las zonas lecheras de la sierra, costa y oriente, aumentando el número de muestras, diferenciando a nivel de ubres, cuartos mamarios y tanques de enfriamiento, para poder implementar programas de control de calidad y enfermedades.

- Se recomienda analizar los actuales parámetros de calidad, bajo los cuales se rige el Ecuador, y establecer una legislación para que los productos lácteos tengan mejores estándares de calidad.

- Para confirmar la presencia de *Brucella* spp., se deben utilizar otras técnicas de diagnóstico de alta sensibilidad y especificidad.

CAPITULO 7: BIBLIOGRAFÍA

Acha, P. y Szyfres, B. (2001). *Brucellosis*. In: *Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals*. Pan American Health Organization, editor. Washington, p. 40-65.

Al Dahouk, S., Nöckler, K., -scholz, H., Pfeffer, M., Neubauer, H., Tomaso, H. (2007). *Evaluation of genus-specific and species-specific real-time PCR assays for the identification of Brucella spp.* Clin Chem Lab Med 45(11): 1464-1470.

Aland, A. (2003). *Lüpsikarja tervise seiremudel ring selle rakendamise loornade tervise hindamisel ja parandamisel*. PhD thesis. Estonian Agricultural University, Tartu.

Alvarez, A.; Pérez, H., Martín, T., Quincosa, J., Sánchez, A. (2009). Fisiología animal aplicada. Universidad de Antioquia, pp: 127-139.

Argenfoods. (2011). *Tabla de composición de Alimentos*. Universidad de Lujan. Argentina. In. Languel. (2012). *Food Composition on the web*. Extraído el 20 de diciembre 2012 de <http://www.unlu.edu.ar/~argenfoods/Tablas/Tabla.htm>.

Arricau-Bouvery N. y Rodolakis, A. (2005). Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? Vet. Res. 36: 327-349.

Aznar, MN., Samartino, LE., Humblet, MF., Saegerman, C. (2012). *Bovine Brucellosis in Argentina and Bordering Countries: Update*. *Transbound Emerg Dis.* doi: [10.1111/tbed.12018](https://doi.org/10.1111/tbed.12018).

Barbano, D., Ma, Y., Santos, M. (2006). *Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life*. Journal of Dairy Science, Vol. 89, supplement, pp: E15-E19.

Barbosa, C., Sarreiro, J., Mestiek, L., de Felicio, M., Velga, M. (2013). *Effect of somatic cell count and mastitis pathogens on milk composition in Gyr cows*. BMC Veterinary Research 9: 67.

Barkema, H., Schukken, Y., Lam, T., Beiber, M., Wilmink, H., Benedictus, G., Brand, A. (1998). *Incidence of Clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. Journal of Dairy Science, Vol 81, Issue 2, pp: 411-419.*

Barkema, H., Schukken, Y., Zadoks, R. (2006). *Invited review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. J. Dairy Sci. 89: 1877-1895.*

Barkema, H., Green, M., Bradley, A., Zadoks, R. (2009). *The role of contagious disease in udder health. J Dairy Sci. 92(10):4717-4729. doi:10.3168/jds.2009-2347.*

Barlow, J., Rauch, B., Welcome, F. (2008). *Association between *Coxiella burnetii* shedding in milk and subclinical mastitis in dairy cattle. Vet Res 39(3), 23, doi: 10.1051/vetres:2007060.*

Berry, D. P., O'Brien, B., O'Callaghan, E. J., Sullivan, K. O., Meaney, W. J. (2006). *Temporal trends in bulk tank somatic cell count and total bacterial count in Irish dairy herds during the past decade. J. Dairy Sci. 89: 4083-4093.*

Berry, EA. y Hillerton, JE. (2007). *Effect of an intramammary teat seal and dry cow antibiotic in relation to dry period length on postpartum mastitis. J. Dairy Sci 90(2), 760-765.*

Bienestar Familiar. (2012). *Tabla de composición de alimentos colombianos. In. Langual. (2012). Food Composition on the web. Extraído 20 de diciembre 2012 de http://alimentoscolombianos.icbf.gov.co/alimentos_colombianos/principal_alimento.asp?id_alimento=768yenviado3=1.*

Bohorquez, P. (2013). *Estudio estadístico de los datos obtenidos en el análisis microbiológico de leche cruda entre unidades IBC y UFC para obtener el cálculo del factor de conversión [Tesis]. Facultad de Ciencias Químicas, Carrera de Química, Universidad Central del Ecuador.*

Bradley, A. J., Breen, J. E., Payne, B., Green, M. J. (2011). A comparison of broad-spectrum and narrow spectrum dry cow therapy used alone and in combination with a teat sealant. *J. Dairy Sci.* 94: 692-704.

Breen, J., Bradley, A., Green, M. (2009). Quarter and cow risk factors associated with a somatic cell count greater than 199,000 cells per milliliter in united Kingdom dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92(7): 3106-3115.

Burvenich, C., Van Merris, V., Mehrzar, J., Diez-Fraile, A., Duchateau, L. (2003). Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet. Res.* 34: 521-564.

Bytyqi, B., Zaugg, U., Sherifi, K., Hamid, A., Gjonbalaj, M., Muji, S., Mehmeti, H. (2010). Influence of management and physiological factors on somatic cell count in new milk in Kosova. *Veterinarski Archiv.* 80(2): 173-183.

Cabral M., y Aguilar, V. (2002). Fundamentos técnico-legales para la ganadería lechera. *Acontecer lechero.* 2 (08): 35-37.

Cadmus, S., Adesokan, H., Stack, J. (2008). The use of the milk ring test and rose bengal test in brucellosis control and eradication in Nigeria. *Jl S.Afr.vet.Ass.* 79(3): 113-115.

Calderón, Al., García, F., Martínez, G. (2006). Indicadores de calidad en leches crudas en diferentes regiones de Colombia. Extraído el 18 de marzo del 2013 de http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0122-02682006000100006yscript=sci_arttext.

Cannon, T. (2003). Why test for components?. <http://www.ahdairy.com/group/articles/whytest.html>.

Castro, A. (1984). Producción bovina. EUNED, pp: 203-221.

Centro de la Industria Lechera. CIL. (2004). La Lechería en la República Argentina. Extraído el 18 de marzo del 2013 de http://www.cil.org.ar/docs/la_lecheria_argentina.pdf.

CFSPH. (2007). Bovine Brucellosis: *Brucella abortus*. http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis_abortus.pdf.

Contero, R. (2008). *La calidad de la leche: un desafío en el Ecuador*. Universidad Politécnica Salesiana (UPS). La Granja 7(1): 25-28.

Corbel, M. J., (2006). Brucellosis in Humans and Animals. WHO-FAO-OIE. Geneva.

Coulon, J.B., Gasqui, P., Barnouin, J., Allier, A., Pradel, P., Pomiès, D. (2002). *Effect of mastitis and related-germ on milk yield and composition during naturally-occurring udder infections in dairy cows*. Anim. Res 51, 383-393.

Cutler, S.J., Whatmore, A.M., Commander, N.J. (2005). *Brucellosis - new aspects of an old disease*. Journal of Applied Microbiology 98: 1270-1281.

Chukwu CC. (1987). *Differentiation of Brucella abortus and Yersinia enterocolitica serotype 09 infections in cattle: the use of specific lymphocyte transformation and brucellin skin tests*. Vet Q. Apr;9(2):134-42.

D'pool, G., Díaz, D. (2005). *Brucellosis*. Facultad de Ciencias veterinarias, Universidad del Zulia. 295-299.

Dang, A., Anand, S. (2007). *Effect of milking systems on the milk somatic cell counts and composition*. Livestock Research for Rural Development 19 (6).

Djabri, B., Bareille, N., Beaudeau, F., Seegers, H. (2002). *Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta-analysis*. Vet. Res. 33:335-357.

Dohoo, I., Meek, A. (1982). *Somatic cell counts in bovine milk*. Can. Vet. J 23: 119-125.

Dufour, S., Fréchette, A., Barkema, H. W., Mussell, A., Scholl, D. T. (2011). *Invited review: effect of udder health management practices on herd somatic cell count*. J. Dairy Sci. 94:563-579.

Elmoslemany, A. M., Keefe, G.P., Dohoo, I. R., Dingwell, R. T. (2009a). *Microbiological quality of bulk tank raw milk in Prince Edward Island dairy herds*. J. Dairy Sci. 92: 4239-4248.

Elmoslemany, A., Keefe, G., Dohoo, I., Jayarao, B. (2009b). Risk factors for bacteriological quality of bulk tank milk in Prince Edward Island dairy herds. Part 1: overall risk factors. *J Dairy Sci.*;92(6):2634-43.

Emmerzaal A, de Wit JJ, Dijkstra T, Bakker D, van Zijderveld FG. (2002). The Dutch *Brucella abortus* monitoring programme for cattle: the impact of false-positive serological reactions and comparison of serological tests. *Vet Q.*Feb;24(1):40-6.

FAO. (2013). *International Network of Food Data Systems (INFOODS)*. Extraído el 18 de marzo del 2013 de <http://www.fao.org/infoods/infoods/es/>.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations (2012). *Animal Production and Health*. Extraído el 07 de noviembre de 2012 de http://www.fao.org/AG/AGInfo/themes/en/dairy/prod_chain.html.

FAO. Organización de las Naciones Unidas para la alimentación en la Agricultura. (2005). *Examen de las políticas sobre productos alimenticios básicos 2003-2004*. In. FAO. (2012). Extraído el 09 de noviembre 2012 de <http://www.fao.org/es/ESC/common/ecg/18/es/BasicPolicyS05.pdf>.

FAO/OMS. (2005). *Conferencia Regional FAO/OMS sobre Inocuidad de los Alimentos para las Américas y el Caribe*. Extraído el 08 de noviembre 2012 de <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/010/af181s.pdf>.

FAO-SMIA. Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Sistema mundial de información y alerta sobre la alimentación y la agricultura*. (2012). *Perspectivas Alimentarias. Análisis del Mercado Mundial*. Extraído el 09 de noviembre 2012 de <http://www.fao.org/docrep/015/a1989s/a1989s00.pdf>.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2013a). *Food and Agricultural commodities production*. Extraído el 07 de noviembre 2012 de <http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=339ylang=en>.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2013b). *Production de produits alimentaires et agricoles*. In. FAO (2012). *Ecuador > Sector agropecuario*.

Extraído el 07 de noviembre 2012 de
<http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=339&lang=es&country=58>.

Fell, E., Cooper, H., Grandmann, D., Robinson, M., Enright, T., Berent, S., Peacock, J., Smith, M., Murphy, M., Spratt, B., Moore, C., Day, N. (2003). How clonal is *Staphylococcus aureus*?. *J. Bacteriol.* 185: 3307-3316.

Forsbäck L, Lindmark-Mansson H, Andrén A, Svennersten-Sjaunja K: Evaluation of quality changes in udder quarter milk from cows with low to moderate somatic cell count. *Animal* 2010, 4:617-626.

Foster, G., Osterman, B., Godfroid, J., Jacques, I., Cloeckart, A., (2007). *Brucella ceti* sp. Nov. And *Brucella pinnipedialis* sp. Nov. For *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int. J. Syst. Evol Microbiol* 57: 2688-2693.

Gall, D., Nielsen, K., Bermudez, M.R., Moreno, F., Smith, P. (2002). Fluorescence polarization assay for detection of *Brucella abortus* antibodies in bulk tank bovine milk samples. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 9:1356-1360.

Giangiacomo, R. (2000). Milk Testing, Quality Control, Hygiene and Safety. In. E-mail conference on "Small Scale Milk Collection and Processing in Developing Countries". Discussion Paper 1.3: Milk Testing, Quality Control, Hygiene and Safety. FAO. 2000.
 Extraído el 07 de noviembre 2012 de
http://www.fao.org/Ag/AGInfo/themes/documents/LPS/DAIRY/ecs/Papers/di_pap13.htm.

Giannechini, R., Concha, C., Rivero, R., Delucci, I., Moreno, J. (2002). Occurrence of Clinical and Sub-Clinical mastitis in Dairy Herds in the West Litoral Region in Uruguay. *Acta Vet Scand* 43: 221-30.

Godden, S., Rapnicki, P., Stewart, S., Fetrow, J., Johnson, A., Bey, R., Farnsworth, R. (2003). Effectiveness of an internal teat seal in the prevention of new intramammary infections during the dry and early-lactation periods in dairy cows when used with a dry cow intramammary antibiotic. *J. Dairy Sci* 86, 3899-3911.

Godfroid, J., Cloeckaert, A., Liautard, J.P., Kohler, S., Fretin, D., Walravens, K., Garin-Bastuji, B., Letesson, J.J. (2005). From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Veterinary Research* 36: 313-326.

Gopaul, K., Koylass, M., Snith, C., Whatmore, A. (2008). Rapud identification of *Brucella* isolates to the speies level by real tima PCR based single nucleotide polymorphism (SNP) analysis. *BMC Microbiology* 8:66.

Graber, H.U., Casey, M.G., Naskova, J. et al. (2007). Development of a highly sensitive and specific assay to detect *Staphylococcus aureus* in bovine mastitic milk. *J. Dairy Sci* 90(10), 4661-4669.

Green, M., Bradley, A., Medley, G., Browne, W. (2007). Cow, Farm and Management Factors During the Dry Period that Determine the Rate of Clinical Mastitis After Calving. *J. Dairy Sci.* 90(8): 3764-3776.

Green, M., Bradley, A., Medley, G., Browne, W. (2008). Cow, Farm and Herd Management Factors in the Dry Period associated with raised somatic cell counts in early lactation. *J. Dairy Sci.* 91: 1403-1415.

Green, M., Green, L., Medley, G., Schukken, Y., Bradley, A. (2002). Influence of dry period bacterial intramammary infection on clinical mastitis in dairy cows. *J. Dairy Sci* 85: 2589-2599.

Gundelach, Y., Kalscheuer, E., Hamann, H., Hoedemaker, M. (2011). Risk factors associated with bacteriological cure, new infection, and incidence of clinical mastitis after dry cow therapy with three different antibiotics. *J. Vet. Sci.* 12(3): 227-233.

Günter, J., Koczan, D., Yang, W., Nürnberg, G., Repsilber, D., Schubert, H., Park, Z., Maqbool, N., Molenaar, A., Seyfert, H. (2009). Assessment of the immune capacity of mammary epithelial cells: comparison with mammary tissue after challenge with *Escherichia coli*. *Vet. Res.* 40:31.

Gutiérrez, H y De la Vara, R. (2008). *Análisis y Diseño de Experimentos*. México. McGraw-Hill/Interamericana Editores, S.A. Segunda edición, p.27.

Hagnestam-Nielsen, C., Emanuelson, U., Berglund, B., Strandberg, E. (2009). Relationship between somatic cell count and milk yield in different stages of lactation. *J. Dairy Sci.* 92: 3124-3133.

Haltia, L., Honkanen-Buzaslski, T., Spiridonova, I., Olkonen, A., Myllys, V. (2006). A study of bovine mastitis, milking procedures and management practices on 25 Estonian dairy herds. *Acta Vet. Sca.* 48:22.

Hamann, J. (2002). Relationships between somatic cell counts and milk composition. *Bulletin of the IDF*, volume 372: 56-59.

Hamed, H., El Feki, A., Gargouri, A. (2008). Total and differential bulk cow milk somatic cell counts and their relation with antioxidant dairy herds in Sweden. *Acta Vet. Scand.* 48: 11.

Haskell, M. J., Langford, F. M., Jack, M. C., Sherwood, L., Lawrence, A. B., Rutherford, K. M. D. (2009). The effect of organic status and management practices on somatic cell counts on UK dairy farms. *J. Dairy Sci.* 92: 3775-3780.

Hernández J., y Bedolla J., (2008). Importancia del conteo de células somáticas en la calidad de la leche (Importance of the somatic cells count in the quality of milk). *Revista electrónica de Veterinaria*. IX, (9): 1695-7504.

Hernández, G. et al. (2008). Neurobrucellosis in stranded dolphins, Costa Rica. *Emerging Infectious Diseases*, v.14, n.9, p.1430-1433.

Hill, R. y Wyse, G. (2006). *Fisiología Animal*. Ed. Médica Panamericana, pp:521- 522.

Hogan, J y Smith, L. (2003). Coliform mastitis. *Vet. Res.* 34:507-519.

Hogeveen, H., Kamphuis, C., Steeneveld, W., Mollenhorst, H. (2010). Sensors and clinical Mastitis- The Quest for the Perfect Alert. *Sensors*, 10, 7991-8009; doi: 10.3390/s100907991

Holdaway, R. (1990). A comparison of methods for the diagnosis of bovine subclinical mastitis within New Zealand dairy herds. PhD Thesis, Massey University, NZ.

Horlet, P., Seegers, H. (1998). Calculated milk production losses associated with elevated somatic cell counts in dairy cows: review and critical discussion. Vet. Res. 29(6):497-510.

Ibarra, M. (2008). Comparative evaluation of the most common milk brucellosis diagnostic tests in the northernmost part of Ecuador. Thesis presented in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in Tropical Animal Health. Press de la Faculté de Médecine Vétérinaire de Prince Leopold Institute of Tropical Medicine. Antwerpen (Antwerp), Belgium

IDF. (1995). Norme IDF 148A:1995, Bult Int. Dairy Fed. 305, 1-8.

INEC. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. (2011). Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua ESPAC. Extraído el 20 de diciembre 2012 de http://www.inec.gob.ec/estadisticas/?option=com_content&view=article&id=50&TB_iframe=true&height=533&width=1164.

INEC-MAG-SICA. (2002). III Censo Nacional Agropecuario. Censos y Encuestas. In. Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca. MAGAP. (2012). Sistema de Información Nacional de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca Extraído el 12 de diciembre 2012 de <http://servicios.agricultura.gob.ec/sinagap/index.php/resultados-nacionales?start=10>.

Jánosi, Sz. & Baltay, Zs. (2004). Correlations among the somatic cell count of individual bulk milk, result of the California Mastitis Test and bacteriological status of the udder in dairy cows. Acta Vet. Hung. 52 (2), pp. 173-183.

Jayarao, B. M., Pillai, S. R., Sawant, A. A., Wolfgang, D. R., Hegde, N. V. (2004). Guidelines for monitoring bulk tank milk somatic cell and bacterial counts. J. Dairy Sci. 87: 3561-3573.

Juozaitiene, V., Juozaitis, A., Micikeviciene, R. (2006). Relationship between somatic cell count and Milk Production or Morphological Traits of udder in Black-and-white cows. Turk J. Vet. Anim Sci. 30:47-51.

Kalmus, P., Viltrop, A., Aasmäe, B., Kask, K. (2006). Occurrence of clinical mastitis in primiparous estonian dairy cows in different housing conditions. Acta Veterinari Scandinavica 48: 21.

Karimuribo, E., Kusiluka, L., Mdegea, R., Kapaga, A., Sindato, C., Kambarage, D. (2005). Studies on mastitis, milk quality and health risks associated with consumption of milk from pastoral herds in Dodoma and Morogoro regions, Tanzania. J. Vet. Sci. 6(3): 213-221.

Kelly, A. L., Tiernan, D., O'Sullivan, C., Joyce, P. (2000). Correlation between bovine milk somatic cell count and polymorphonuclear leukocyte level for samples of bulk milk and milk from individual cows. J. Dairy Sci. 83: 300-304.

Klinkon, M., Zadnik, T., Nemec, M. (2000). Vpliv reje, pasme, zaporednega stevila laktacij, obdobja laktacije, sezone instevila somatskih celic na osnovne sestavine mleka.

Klungel, G., Slaghuis, B., Hogeveen, H. (2000). The effect of the introducción of automatic milking systems on milk quality. Journal of Dairy Science, Vol. 83, Issue 9, pp:1998-2003.

Komine, Y., Komine, J., Kai, K., Kuroishi, T., Itagaki, M., Obara, Y., Kumagai, K. (2006). A new doagnostic indicator using Concavalin A low-affinity Lactoferrin levels in Mammary gland secretion in Mastitic Drying Cows. J. Vet. Med. Sci. 68(1): 59-63.

Lasagno. M., Reinoso, E., Dieser, S., Calvinho, L., Buzzola, F., Vissio, C., Bogni, C., Odierno, L. (2011). Phenotypic and genotypic characterization of *Streptococcus uberis* isolated from bovine subclinical mastitis in Argentinean dairy farms. Revista Argentina de Microbiología 43: 212-217.

Le Roux, Y., Laurent, F., Moussaoui, F. (2003). Polymorphonuclear proteolytic activity and milk composition change. Vet Res, 34:629–645.

Lee, J., Bannerman, D., Paape, M., Zhao, X. (2006). Characterization of cytokine expression in milk somatic cell during intramammary infections with *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* by real-time PCR. *Vet. Res.* 37:219-229.

Lievaart, J. J., Kremer, W. D. J., Barkema, H. W. (2007). Short communication: comparison of bulk milk, yield-corrected, and average somatic cell counts as parameters to summarize the subclinical mastitis situation in dairy herd. *J. Dairy Sci.* 90: 4145-4148.

Lievaart, J. J., Reneau, J. K., Kremer, W. D. J., Barkema, H. W. (2011). Short communication: influence of sampling interval on the accuracy of predicting bulk milk somatic cell count. *J. Dairy Sci.* 94: 804-807.

Lindmark-Mansson, H., Bränning, C., Aldén, G., Paulsson, M. (2006). Relationship between somatic cell count, individual leukocyte population and milk components in bovine udder quarter milk. *Int. Dairy J.* 16:717-727.

Lucero, N.E., Ayala, S.M., Escobar, G.I., Jacob, N.R. (2008). *Brucella* isolated in humans and animals in Latin America. *Epidemiological Infection* 136: 496-503.

Madkour, M.M. (2001). *Brucellosis: Overview*. In: *Madkour's Brucellosis*. M.M.Madkour, editor. *Springer-Verlag.Berlin Heidelberg*, p. 1-4.

MAG-SESA. (2009). *Prevención y control de la brucelosis bovina en Ecuador*. *Ministerio de Agricultura y Ganadería, Servicio Ecuatoriano de Sanidad Agropecuaria.*

Marín, C., Alabart, J., Blasco, J. (1996). Effect of Antibiotics Contained in Two *Brucella* Selective Media on Growth of *Brucella abortus*, *B. melitensis*, and *B. ovis*. *Journay of Clinical Microbiology*. Vol. 34, No. 2, p. 426–428.

Memish, Z.A. y Balkhy, H.H. (2004). *Brucellosis and International Travel*. *Journal of Travel Medicine* 11: 49-55. Nicoletti, P. 2001b. *Control, Eradication and Prevention*. In: *Madkour's Brucellosis* M.M.Madkour, editor. *Springer-Verlag.Berlin Heidelberg*, p. 280-285.

Miller, R., Emanuclsson, U., Persson, E. (1983). Relationships of milk somatic cell counts to daily milk yield and composition. *Acta Agric. Scand.* 33: 298-223.

Monardes, H., Haye, J. (1985). Genetic and phenotypic relationships between lactation cell counts and milk yield and composition of Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 68(5): 1250-6.

Nielsen, K. (2002). Diagnosis of brucellosis by serology. *Veterinary Microbiology* 90: 447-459.

Nutrient Data Laboratory. NAL. (2012). Composition of Foods Raw, Processed, Prepared USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 25. In. USDA-United States Department of Agriculture. (2012). Food Composition. Extraído el 20 de noviembre 2012 de <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/201?fg=Dairy+and+Egg+Products&man=y&facet=y&format=y&count=y&max=25&offset=200&sort=y&qlookup=>.

O'Grady, L. y Doherty, M. (2011). Focus on Bovine Mastitis: knowledge into practice. I. *Vet. J. Vol.* 62:4.

Ogola, H., Shitandi, A., Nanua, J. (2007). Effect of mastitis on raw milk compositional quality. *J. Vet. Sci.* 8(3), 237-242.

Olechnowicz, J. y Jaskowskj, J. M. (2012). Somatic cells count in Cow's Bulk Tank Milk. *J. Vet. Sci.* 74(6): 681-686.

Olmedo, S (2010). Aislamiento e identificación de *Brucella* spp. Tesis para optar por el título profesional de Bioquímica clínica. Universidad Central del Ecuador. Facultad de Ciencias Químicas. Escuela de Bioquímica y Farmacia.

Organización Mundial de Sanidad Animal. OIE. (2012). Brucelosis. In. OIE. Sanidad Animal en el Mundo. (2012). Extraído el 05 de enero 2012 de http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Media_Center/docs/pdf/Disease_cards/BCLS-ES.pdf.

Osterås, O. y Sølverød, L. (2009). Norwegian mastitis control programme. *Irish Veterinary Journal.* Vol. 62. Supplement: 26-33.

Paape, M., Duenas, M., Wettermann, R., Douglass, L. (2000). Effects of intramammary infection and parity on calf weaning weight and milk quality in beef cows. J. Anim. Sci. 78:2508-2514.

Paganelli, R., Di Iorio, A., Cherubini, A., Lauretani, F., Mussi, C., Volpato, S., Abate, M., Abate, G., Ferrucci, L. (2006). Frailty of older age: The role of the endocrine-immune interaction. Curr. Pharm. Des. 12: 3147-3159.

Pantoja, J. C. F., Hulland, C., Ruegg, P. L. (2009). Dynamics of somatic cell counts and intramammary infections across the dry period. Prev. Vet. Med. 90: 43-54.

Pappas, G., Akritidis, N., Bosilkovski, M., Tsianos, E. (2005). Brucellosis. N Engl J Med 352:2325-36.

Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., Christou, L., Tsianos, E.V. (2006). The new global map of human brucellosis. Lancet Infectious Diseases 6: 91-99.

Patterson J M, Deyoe B L 1976 Effect of physical properties of milk fat globules on Brucella ring test sensitivity. Journal of Dairy Science 60: 851–856.

Pavel, E., Gavan, C. (2011). Seasonal changes in bulk tank composition of Dairy cows. Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies, 44 (2).

Philpot, W.N. y Pankey, J.W. (1975). Review of microorganisms that reportedly cause mastitis. Hill Farm Research Station, Homer, LA, USA, pp. 118-120.

Pol, M. y Ruegg, P. (2007). Relationship between antimicrobial usage and antimicrobial susceptibility of Gram-positive mastitis pathogens. J. Dairy Sci. 90:262-273.

Poutrel, B., Caffin, J.P., Rsainard, P. (1983). Physiological and pathological factors influencing bovine serum albumin content of milk. J. Dairy Sci. 66:535-541.

Pyörälä, S. (2003). Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. Vet. Res. 34: 565-578

Quédraogo, G., Millogo, V., Anago-Sidibé, A., Kanwé, B. (2008). Relationship etween somatic cell counts, dairy cattle milk yield and composition in Burkina Faso. *African Journal Biochemistry Research Vol 2 (2)*, pp. 056-060.

Rainard, P., Riollet, C. (2006). Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet. Res.* 37: 369-400.

Rajčević, M., Potočnik, K., Levstek, J. (2003). Correlations between somatic cells count and milk composition with regard to the season. *Agriculture Conspectus Scientifics*, vol. 68. N° 3 (221-226).

Reichmuth, J. (1975). Somatic cell counting-interpretation of results. In proc. Of Sem. On Mast. Count. 1975 IDF Doc 85. Pp. 93-109.

Riekerink, R., Karkema, H., Veenstra, S., Poole, D., Dingwell, R., Keefe, G. (2006). Prevalence of contagious mastitis pathogens in bulk tank milk in Prince Edward Island. *Can Vet J.* Vol.47.

Rivas A., Quimby F., Blue J., Coksaygan O. (2001). Longitudinal Evaluation of Bovine Mammary Gland Health Status by Somatic Cell Counting, Flow Cytometry and Cytology. *J Vet Diagn Invest.* 13(5):399-407.

Rivas, A., Tadevosyan, F., Quimby, F., Coksaygan, T., Lein, D. (2002). Identification of subpopulations of bovine mammaty-gland phagocytes and evaluation of sensitivity and specificity of morphologic and functional indicators of bovine mastitis. *Canadian J. Vet. R.* 66:165-172.

Rivera, D.Y., Rueda, O.E., Calderon, C.P., Marino, O.C., Gall, D. y Nielsen, K. 2003. Comparative evaluation of the indirect enzyme-linked immunosorbant assay in milk for the detection of cattle infected with *Brucella abortus*, in the herds located in the province of Cundinamarca, Colombia. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties* 22: 1065-1075.

Robert, L. (2007). Mejora de la eficiencia y de la competitividad de la economía Argentina. Extraído 16 de marzo de 2013 de <http://www.inti.gob.ar/lacteos/pdf/ROBERT/L.pdf>.

Ryšánek, D. y Babák, V. (2005). Bulk tank milk somatic cell count as an indicator of the hygiene status of primary milk production. *J. Dairy Res.* 72:400-405.

Ryšánek, D., Zouharova, M., Babák, V. (2009). Monitoring major mastitis pathogens at the population level based on examination of bulk tank milk samples. *J. Dairy Res.* 76: 117-123.

Samartino, L.E. (2002). Brucellosis in Argentina. *Veterinary Microbiology* 90: 71-80.

Sant'Anna, A. C., y Paranhos da Costa, M. J. R. (2011). The relationship between dairy cow higienic and somatic cell count in milk. *J. Dairy Sci.* 94: 3855-3844.

Savado, A., Outtara, C., Savado, P., Quattara, A., Barro, N., Traoré, A. (2004). Microorganism involved in Futani traditional fermented milk in Burkina Faso, Pakistan. *J. Nutrition* 3 (2): 134-139.

Schoiz, H., Hubalek, Z., Sedláček, I., Vergnaud, G., Tomaso, H., Al Dahouk, S., Melzer, F., Kampfer, P., Neubauer, H., Cloeckert, A., Maquart, M., Zygmunt, M., Whatmore, A., Falsen, E., Bahn, P., Göllner, C., Pfeffer, M., Huber, B., Busse, H., Nöckler, K. (2008). *Brucella microti* sp. Nov., isolated from the sommon vole *Microtus arvalis*. *Int. J Syst. Evol Microbiol* 58: 375-382.

Schukken, Y. H., Wilson, D. J., Welcome, F., Garrison-Tikofsky, L., Gonzalez, R. N. (2003). Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Vet. Res.* 34: 579-596.

Schukken, Y., Grommers, F., van De Geer, D., Erb, H., Brand, A. (1991). Riks factors for clinical mastitis in herds with a Low bulk milk somatic cell count. 2. Riks factors for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Dairy Science. Volume 73, Issue 12, Pages 3463–3471.*

Schultz, L. (1977). Somatic cells in milk-physiological aspects and relationship to amount and composition of milk. *Journal of Food Protection. Volume 40(2): 125-131.*

Sears, P. M. y McCarthy K. K. (2003). Management and treatment of staphylococcal mastitis. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* 19:171-185.

Seegers, H., Fourichon, C., Beaudeau, F. (2003). Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet. Res.* 34:475-491.

Sela, S. et al. (2007). *J Dairy Res* 74: 425-9

SEM. Secretaría de Economía Mexicana. (2012). Análisis del sector lácteo en México. Extraído el 31 de octubre 2012 de http://www.economia.gob.mx/files/comunidad_negocios/industria_comercio/informacionSectorial/analisis_sector_lacteo.pdf.

Shamelian, S. (2000). Diagnosis and treatment of brucellosis. *The Netherlands Journal of Medicine* 56: 198-199.

Sharif, A., Muhammad, G. (2008). Somatic cell count as an indicator of udder health status under modern dairy production [a review]. *Pakistan Vet J.*, 28:194–200.

Sharma, N., Slugh, N., Bbadwal, M. (2011). Relationship of Somatic cell count and mastitis: an overview. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* Vol. 24, No. 3: 429-438.

Singh, M., Dang, A. (2002). Somatic cell counts of milk, National Dairy Research Institute, Publication No. 1/2002.

Sistema de Investigación sobre la problemática Agraria en el Ecuador. SIPAE. (2007). Libre comercio y Lácteos: La producción de leche en el Ecuador entre el Mercado Nacional y la Globalización. In. FLACSO ANDES. (2011). Extraído 07 de noviembre 2012 de http://www.flacsoandes.org/biblio/shared/biblio_view.php?bibid=110959ytab=opac.

Skrzypek, R., Wójtowski, J., Fahr, R. D. (2004). Factors affecting somatic cell count in cow bulk tank milk – a case study from Poland. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* 51: 127-131.

Smith, E., Green, L., Medley, G., Bird, H., Dowson, C. (2005). Multilocus Sequence Typing of *Staphylococcus aureus* Isolated from High-Somatic-Cell-Count Cows and the Environment of an Organic Dairy Farm in the United Kingdom. *J. Clin. Micro.* Vol. 43, No. 9, p. 4731-4736.

Smith, R. (1962). Fisiología de la lactancia. IICA Biblioteca Venezuela, pp:103-120.

Stack, J., Harrison, M., Perrett, L. (2002). Evaluation of a selective medium for *Brucella* isolation using natamycin. Journal of Applied Microbiology, 92, 724–728.

Suriyasathaporn, W., Vinitketkumnien, U., Chewonarin, T., Boonyayatra, S., Kreausukon, K., Schukken, Y. H. (2006). Higher somatic cell counts resulted in higher malondialdehyde concentrations in raw cow's milk. Int Dairy J. 16: 1088-1091.

Tamime, A. (2009). Milk Processing and Quality Management. Blackwell Publishing Ltd., pp:8-100.

Timms, L., Sommer, D., Schultz, L. (1986). Role of minor pathogens in mastitis, J. Dairy Sci. 68:202.

Timms, L.L. y Schultz, L.H. (1987). Dynamics and coagulase-negative staphylococcal intramammary infections. J. Dairy Sci. 70: 2648-2757.

United States Department of Agriculture. USDA. (2003). *Brucellosis Eradication: Uniform Methods and Rules*. In. USDA. (2007). *United States Health Report*. Extraído 20 de noviembre 2012 de http://www.aphis.usda.gov/animal_health/animal_diseases/brucellosis/downloads/um.r_brucellosis.pdf.

United States Department of Agriculture. USDA. (2007). *United States Health Report*. Extraído el 20 de noviembre 2012 de http://www.aphis.usda.gov/publications/animal_health/content/printable_version/ahr2007.pdf

Urech, E., Puhan, Z., Schallibaum, M. (1999). Changes in protein fraction as affected by subclinical mastitis. J. Dairy Sci. 82:2402-2411.

Urroz, C. (1991). Elementos de Anatomía Y Fisiología Animal. EUNED, pp: 231-244.

Van Schaik, G., Green, L. E., Guzman, D., Esparza, H., Tadich, N. (2005). Risk factors for bulk milk somatic cell counts and total bacterial counts in smallholder dairy farms in the 10th region of Chile. Prev. Vet. Med. 67: 1-17.

Vizcarrondo, M y Gutierrez, S. (2002). Idetificación microbiana. Extraído el 25 de julio de 2013 de http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/08_Tema_12_identicaci%C3%B3n.pdf

Ward G.E y Schultz L.H. (1972). Relationship of somatic cells in quarter milk to type of bacteria and production. J. Dairy Sci. 55: 1428-1431.

Whist, A., Osterås, O., Solverod, L. (2006). Clinical mastitis in Norwegian herds after a combined selective dry-cow therapy and teat-dipping trial. Journal of Dairy Science 89, 4649-4659.

Wolff, C., Stevenson, M., Emanuelson, U., Egenvall, A., Lindberg, A. (2011). Spatial patterns of recorded mastitis incidence and somatic cell counts in Swedish dairy cows: implications for surveillance. Geo. Health 6(1):117-123.

Xavier, M., Cosa, É., Paixão, T., Santos, R. (2009). The genus *Brucella* and clinical manifestations of brucellosis. Ciência rural, Santa Maria, v.39, n.7, p.2252-2260.

Zadoks, R. y Fitzpatrick, JL. (2009). Changing trends in mastitis. Irish Vet. J. 62:59-70.

Zadoks, R. y Middleton, J. (2011). Molecular Epidemiology of Mastitis Pathogens of Dairy Cattle and Comparative Relevance to humans. J Mammary Gland Biol Neoplasia 16: 357-372.

Zhao, X. y Lacasse, P. (2008). Mammary tissue damage during bovine mastitis causes and control. J. Anim. Sci. 86:57-65.

BIOGRAFIA

Lugar y fecha de nacimiento: Quito, 19 de Agosto de 1989.

Formación académica:

Unidad Educativa “María Francisca de las Llagas”. Quito, Ecuador. Bachiller Físico-Matemático. Septiembre 1995-Agosto 2007.

Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE. Sangolquí, Ecuador. Ingeniería en Biotecnología. Septiembre 2007-October 2013.

Suficiencia en el Idioma Inglés, Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE. Sangolquí, Ecuador. Facultas de Idiomas. Marzo 2008-Septiembre2012.

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

Patricia Alison Mera Ruiz

**DIRECTORA DE LA CARRERA DE
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

María Augusta Chávez MVZ. M. Sc.

DELEGADO UNIDAD DE ADMISIÓN Y REGISTRO

Abg. Carlos Orozco Bravo, M. Sc.

Sangolquí, 15 de Octubre del 2013