



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Identificación de la Población Bacteriana en Leche de Tanque, Recuento de Células Somáticas y su Asociación con 11 Variables en Hatos en el Valle del Cauca

Jorge Humberto Guerrero Quiceno

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Palmira, Colombia

2017

Identificación de la Población Bacteriana en Leche de Tanque, Recuento de Células Somáticas y su Asociación con 11 Variables en Hatos en el Valle del Cauca

Jorge Humberto Guerrero Quiceno

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Magíster en Ciencias Agropecuarias

Director:

DSc., Rómulo Campos Gaona

Codirector

DSc., Alejandro Ceballos Márquez,

Línea de Investigación:
Producción Animal Tropical

Grupo de Investigación:
Hartón del Valle

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Palmira, Colombia

2017

(Dedicatoria o lema)

Agradezco y dedico este título a mi hija Laura Cristina y mi esposa Sandra por la paciencia durante todo el tiempo de estudio, por entender y aceptar el sacrificio que requiere el crecimiento profesional y personal, convencidos de que algún día valdrá la pena por la unión familiar.

A mis padres Martha y Muriel por su apoyo incondicional, sus manifestaciones de cariño, sus oraciones y también por sus consejos porque gracias a ellos, hoy estoy logrando un objetivo más en mi vida. También agradezco a mis hermanos, primos, tías, tíos, suegros y cuñados por el apoyo que de diferentes formas permitieron obtener este título.

A mis sobrinos Juan José y Emmanuel porque motivan la unión familiar, necesaria para que todos los esfuerzos sean más valorados.

Agradecimientos

Agradezco a Dios por permitirme culminar este proyecto, por proporcionarme la sabiduría, paciencia y la salud que este proyecto necesitaba. Por sus bendiciones durante todo el tiempo de estudio para superar los diferentes obstáculos presentados.

A toda mi familia por su apoyo incondicional durante todo el proceso de la maestría.

Al profesor Rómulo Campos Gaona, por brindar la oportunidad de iniciar la maestría, por creer y dar la confianza para el desarrollo de éste proyecto, convencido de que valdría la pena por el aporte a los sistemas productivos del Valle del Cauca. Por entregar el conocimiento en diferentes áreas, mil gracias por todo el apoyo, la paciencia y la comprensión.

A COGANCEVALLE por permitir el tiempo para realizar la maestría.

Al Doctor Andrés Sandoval por el apoyo para llevar a cabo éste proyecto personal.

Al Profesor Alejandro Ceballos, por permitir ser parte de éste proyecto y por el apoyo brindado.

A Erika Hernández por su gestión en la financiación del proyecto.

A la vicerrectoría de investigación de la Universidad Nacional de Colombia y la dirección de investigación de la sede Palmira por la financiación del proyecto.

A los 30 hatos y sus propietarios que permitieron realizar los muestreos durante 6 meses convencidos de que les aportaría la información necesaria para mejorar sus sistemas productivos.

Resumen

El objetivo fue identificar los agentes microbiológicos asociados a la calidad higiénica de la leche en los tanques de leche fría de 30 hatos del Valle del Cauca y determinar su relación con el recuento de células somáticas (RCS). Se seleccionaron 30 hatos donde se efectuaron 4 muestreos entre junio y diciembre. Las muestras de leche fueron tomadas de tanque y enviadas a laboratorio para análisis del (RCS) y cultivo bacteriológico. Los valores del RCS fueron transformados y asociados con las variables: días en leche, producción, precipitación, tipo de descarga de la leche al tanque, número de vacas en ordeño, buenas prácticas ganaderas, ubicación de los hatos (m.s.n.m.), tipo de ordeño, caracterización racial, suministro de pollinaza y total de bacterias identificados en cada muestra, así como también, se buscó la asociación con patógenos infecciosos. Este estudio demostró que solo las variables tipo de descarga, total de bacterias, tipo de ordeño y suministro de pollinaza estaban asociadas con el RCS. Las variables tipo de descarga y total de bacterias estuvieron relacionadas con microorganismos de tipo infeccioso. En los cultivos se identificaron 14 bacterias, que fueron agrupadas en: 1. Ambientales, con una prevalencia del 86% representados por: Bacilos Gram-negativos (96,7%), *Streptococcus* spp. (76,7%), *Staphylococcus coagulasa negativos* (62,5%), *Citrobacter* spp. (50,8%), *Enterobacter* spp. (26,7%), *Streptococcus uberis* (23,3%), bacilos Gram-positivos (16,7%), *Proteus* spp. (14,2%), *Pseudomonas* spp. (14,2%), *Klebsiella* spp. (5%), *Streptococcus dysgalactiae* (2,5%), *E. coli* (1,7%) y 2. Patógenos infecciosos con una prevalencia del 14% representados por: *Staphylococcus aureus* (38,3%) y *Streptococcus agalactiae* (15%).

Palabras clave: Leche, bacterias, calidad higiénica, células somáticas, vacas y tanque de enfriamiento.

Abstract

In study carried out in the Valle del Cauca, thirty milk farms were selected, where four samples were taken in a period between June and December 2015. The milk samples were taken from tank and sent to the laboratory for analysis of the somatic cell count (SCC) and bacterial culture. The values of the SCC were transformed to a linear classification and correlated with the variables: days in milk, milk production, precipitation, type of discharge from the milk to the tank, number of cows in milking, good herding practices, location of the herds (m.o.s.l), type of milking, race profiling, supply of pollinaza and total of bacteria identified in each sample, as well as, the association with the presence of infectious pathogens was considered, considering the 95% confidence intervals and a level of significance for the values of $P < 0.05$. This study showed that only the variables; type of discharge, total of pathogens days in milk, type of milking and supply of pollinaza significantly affected the RCS. On the other hand, the variables type of discharge and total of pathogens were associated with the presence of pathogens infectious. Fourteen bacteria were identified in the cultures, taking a prevalence of 86% of environmental pathogens represented by: Gram-negative bacilli (96.7%), *Streptococcus* spp. (76.7), *Staphylococcus coagulase negative* (62.5%), *Citrobacter* spp. (50.8%), *Enterobacter* spp. (26,7%), *Streptococcus uberis* (23.3%), Gram-positive (16.7%), *Proteus* spp. (14.2%), *Pseudomonas* spp. (14.2%), *Klebsiella* spp. (5%), *Streptococcus dysgalactiae* (2.5%), *E. coli* (1.7%), and a prevalence of 14 per cent of infectious pathogens represented by: *Staphylococcus aureus* (38.3%) and *Streptococcus agalactiae* (15%). The objective of this project was to identify the microbiological agents associated with the hygienic quality of the milk in the cold milk tanks of 30 herds of the Cauca Valley and to determine its relation with the RCS.

Keywords: Milk, bacteria, hygienic quality, somatic cells, cows and cooling tank.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de gráficos.....	XIII
Lista de tablas	XIV
Lista de figuras.....	XV
Introducción	1
1. Marco referencial.....	5
1.1 Contexto de la Producción de Leche y su calidad.....	5
1.1.1 Cifras Globales sobre Producción Lechera y su Importancia Económica.....	5
1.2 Descripción de principales microorganismos encontrados en tanque de almacenamiento de leche.....	15
1.2.1 Microorganismos ambientales.....	15
• Bacilos Gram-negativos	16
• <i>Streptococcus</i> spp.....	16
• <i>Staphylococcus coagulasa negativos (SCN)</i>	17
• <i>Citrobacter</i> spp.....	17
• <i>Enterobacter</i> spp.....	18
• <i>Streptococcus uberis</i>	18
• Bacilos Gram-positivos.....	18
• <i>Proteus</i> spp.....	19
• <i>Pseudomona</i> spp.	19
• <i>Klebsiella</i> spp.	19
• <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	20
• <i>Escherichia coli</i>	20
1.2.2 Microorganismos infecciosos.	21
• <i>Staphylococcus aureus</i>	21
• <i>Streptococcus agalactiae</i>	21
2. Metodología.....	25
2.1 Descripción de las variables consideradas en el trabajo para asociar a los resultados del RCS y la presencia de bacterias de tipo infeccioso.	25
2.1.1 Variable N° 1 Ubicación	25
2.1.2 Variable N° 2, Precipitación.....	26
2.1.3 Variable N° 3, Tipo de descarga de la leche (directo a tanque o a cantina)	27

2.1.4	Variable N° 4, Número de vacas en ordeño	27
2.1.5	Variable N° 5, Certificación en Buenas Prácticas Ganaderas (BPG)....	27
2.1.6	Variable N° 6, Tipo de ordeño	27
2.1.7	Variable N° 7, Caracterización racial.....	28
2.1.8	Variable N° 8, Producción de leche.....	28
2.1.9	Variable N° 9, Días en leche	28
2.1.10	Variable N° 10, Suministro de pollinaza	28
2.1.11	Variable N° 11, Total de bacterias identificadas por muestra	29
2.2	Procedimiento para la toma de muestras	29
2.3	Procedimiento para la realización del cultivo	30
2.4	Procedimiento para análisis de células somáticas.....	31
2.5	Análisis estadístico.....	31
2.5.1	Conglomerados	32
2.5.2	Análisis de las variables microorganismos infecciosos (<i>S. aureus</i> y <i>S. agalactiae</i>) y RCS.....	32
3.	Resultados y Discusión.....	35
3.1	Población bacteriana.....	35
3.1.1	Análisis de las variables independientes frente a la presencia de microorganismos infecciosos (<i>S. aureus</i> y <i>S. agalactiae</i>).....	40
3.2	Recuento de Células Somáticas (RCS).....	41
3.3	Relación entre la CL y las diferentes variables analizadas	47
3.3.1	Relación entre la CL del RCS y los días en leche	47
3.3.2	Relación entre la CL del RCS y el tipo de ordeño (manual o mecánico).....	48
3.3.3	Relación entre la CL del RCS y la precipitación	49
3.3.4	Relación entre la CL del RCS y el número de vacas en ordeño.....	52
3.3.5	Relación de la CL del RCS con la producción de leche de cada hato ..	53
3.3.6	Relación de la CL del RCS con la caracterización racial (predominio de razas <i>Bos taurus</i> o <i>Bos indicus</i>).....	54
3.3.7	Relación de la CL del RCS con la ubicación de los hatos (m.s.n.m.) ...	55
3.3.8	Relación de la CL del RCS con el hecho de estar certificados o no en buenas prácticas ganaderas (BPG)	56
3.3.9	Relación lineal del RCS con microorganismos de tipo infeccioso (<i>S. aureus</i> y <i>S. agalactiae</i>)	58
3.3.10	Relación de la CL del RCS con la cantidad de bacterias identificadas en cada muestra	59
4.	Conclusiones y recomendaciones	61
4.1	Conclusiones.....	61
4.2	Recomendaciones.....	61
A Anexo: Resumen total de las variables analizadas para cada uno de los sistemas de producción en el estudio.....		63
B Anexo: Relación de la precipitación en la zona de ubicación de cada uno de los sistemas de explotación del estudio, durante la fase experimental.....		65
Bibliografía		67

Lista de gráficos

	Pág.
Gráfico 3-1. Resultados del recuento del células somáticas, según clasificación propuesta por Jayarao <i>et al.</i> (2004).....	42
Gráfico 3-2. Resultados del recuento del células somáticas, según clasificación del NMC 2001.	43
Gráfico 3-3. Distribución según número de vacas en ordeño.....	52

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1. Relación entre la clasificación lineal de células somáticas y el recuento de células somáticas.....	13
Tabla 3-1: Población bacteriana identificada en los 120 análisis realizados y su frecuencia de identificación	35
Tabla 3-2. Análisis de efectos de las variables significativas frente a los microorganismos de tipo infeccioso	40
Tabla 3-3. Estimadores de Coeficientes de disparidad	41
Tabla 3-4. Frecuencia de la CL de células somáticas de acuerdo a clasificación propuesta por NMC 2006.....	44
Tabla 3-5. Variables que mostraron significancia frente al RCS.	47
Tabla 3-6. Promedios de precipitación en 4 momentos en las zonas de muestreo comparado con la clasificación lineal del RCS.	50
Tabla 3-7. Comparativo de precipitación en los años 2015, 2014 y 2013 en las zonas las zonas donde fueron realizados los muestreos.	50
Tabla 3-8. Resultados del recuento de células somáticas de acuerdo a número de vacas en ordeño.....	53
Tabla 3-9. Agrupamientos de los hatos de acuerdo a la producción de leche en cada sistema productivo.	54
Tabla 3-10. Resultados de la CL del RCS agrupados de acuerdo a la caracterización racial.	55
Tabla 3-11. Resultados de la CL del RCS agrupados de acuerdo a la ubicación de los predios (m.s.n.m.)	56
Tabla 3-12. Resultados de la CL del RCS y su relación con la certificación o no en Buenas Prácticas Ganaderas (BPG).....	57
Tabla 3-13. Relación del RCS con las BPG en 4 muestreos realizados en leche de tanque en el Valle del Cauca.	58
Tabla 3-14. Relación de la cantidad de bacterias identificadas con la clasificación lineal del RCS.	60

Lista de figuras

Figura 2-1. Mapa del Valle de Cauca y la ubicación de hatos.....	26
---	----

Introducción

La calidad microbiológica de la leche tiene su origen a nivel de la producción primaria (Molineri *et al.*, 2009). La salud e higiene de las vacas, el ambiente en el cual se encuentran y ordeñan los animales, las prácticas de ordeño (lavado y desinfección de pezones, correcto funcionamiento del equipo de ordeño, limpieza del equipamiento que toma contacto con la leche) y el almacenamiento de la leche, son factores fundamentales que impactan en la contaminación de la leche producida (Calderón *et al.*, 2012).

La calidad integral de la leche adquiere una gran importancia, no solamente desde el punto de vista de la salud pública, sino también de la industria, estando relacionada con la composición general, la presencia de contaminantes y la presencia bacterias que puedan alterar sus propiedades. Obviamente, se necesita de todos los sectores involucrados en la producción primaria, conservación, transporte, almacenamiento y transformación (Revelli *et al.*, 2011).

La producción de leche con baja presencia de microorganismos empieza en la granja y está influenciado por muchos procedimientos relacionados con prácticas de manejo. A nivel de finca, la contaminación de la leche del tanque ocurre a través de tres fuentes: contaminación bacteriana desde la superficie externa de la ubre y pezones, provenientes del equipo de ordeño, y de los organismos presentes en glándula mamaria (Elmoslemany *et al.*, 2010)

Las cantidades y tipos de microorganismos en leche de tanque proporcionan información importante sobre las condiciones de higiene durante las etapas de la producción de leche en el hato y permite diferenciar entre los bacterias contaminantes provenientes de las fuentes ya mencionadas y los que provienen de glándula mamaria (Jayarao *et al.*, 2004).

Desde principios de la década de 1990, los investigadores han utilizado leche de tanque para diagnosticar múltiples problemas que podrían existir en un hato lechero, muchos de

ellos relacionados con la calidad de la leche. Los consultores manifiestan interés en el análisis de leche de tanque como una herramienta para determinar la calidad microbiológica de la leche, para identificar posibles agentes patógenos causantes de infección en glándula mamaria y también para solucionar problemas relacionados con altos recuentos de células somáticas (Reyes *et al.*, 2017). Por esto, muchas cooperativas lácteas han implementado los análisis de leche de tanque para recompensar a los productores de leche que se destacan en producir leche de alta calidad (Jayarao *et al.*, 2004), porque los agentes microbianos que pueden habitar en glándula mamaria y los provenientes de contaminación, afectan la calidad de la leche, generando consecuencias más allá de la granja lechera, en especial sobre los procesos industriales (Hogeveen *et al.*, 2011; Gutiérrez, 2008).

Las bacterias que se pueden encontrar en leches de tanque pueden ser clasificados en 2 grupos: el primero se clasifican como patógenos contagiosos y son los que pueden vivir en glándula mamaria, éstos son: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*), *Corynebacterium bovis* y *Mycoplasma* (Royster & Wagner, 2015 y Calderón & Rodríguez, 2009). El segundo grupo, de bacterias que tienen como hábitat normal el ambiente y son llamados ambientales, entre estos los *Staphylococcus coagulasa negativos* (SCN), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella*, *Streptococcus uberis* (*S. uberis*), *Streptococcus dysgalactiae* (*S. dysgalactiae*) y *Streptococcus* spp. (Sayed *et al.*, 2009). Esta población bacteriana a su vez, tienen dos clasificaciones que son: Gram-positivos y Gram-negativos. Las bacterias Gram-negativas que crecen en leche incluyen un grupo de gran importancia y éstas pueden ser contaminantes saprofitos, pero en cualquier momento se pueden patogenizar en la glándula mamaria. Este grupo está compuesto por micrococcos, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacilos*, *Corynebacterium*, *Bacilos* y *Clostridium* (Ramírez *et al.*, 2009). Esta identificación de los agentes tiene gran importancia en los sistemas productivos por las pérdidas económicas que ocasionan y por la posibilidad de identificar el origen de estas bacterias (Molineri *et al.*, 2009). Vásquez (2012), en un estudio realizado durante 14 años en zona lechera de Antioquia (Colombia), concluye que las pérdidas económicas atribuidas a procesos infecciosos, por cada caso presentado fueron de \$ 627.961, de los cuales \$240.564 fueron debidas a disminución en la producción láctea, \$ 132.170 al descarte de leche durante y después del tratamiento, \$ 77.844 a medicamentos, \$ 35.889 a incremento de la mano de obra en los tratamientos realizados, \$ 52.472 en servicios veterinarios, \$

61.916 en descarte de animales y \$ 27.106 en muertes. Estas pérdidas son ocasionadas por agentes microbiológicos que en la mayoría de los casos no son identificados y por lo tanto no se tomaron las medidas correctas para evitar posteriores presentaciones de la enfermedad.

Recuento de Células Somáticas

Las células somáticas son en su mayoría células del sistema inmune (Schukeen *et al.*, 2003) que aparecen en grandes cantidades cuando se da un proceso infeccioso. Según Ramírez *et al.* (2009), éstas células somáticas son en un 98% leucocitos como macrófagos, neutrófilos y linfocitos que se incrementan rápidamente cuando inicia la infección, donde se presenta lisis de la barrera endotelial, lo que origina una mayor difusión de componentes del plasma sanguíneo al lumen de los acinos incrementando la presencia de éstas células y en un 2% células epiteliales que se presentan por un proceso fisiológico considerado normal (Barkema *et al.* 2006).

La mastitis subclínica en Colombia tiene un impacto directo sobre la calidad de la leche y puede ser monitoreada a través del recuento de células somáticas del tanque (Reyes *et al.*, 2017). Una vez conocido el valor del RCS, las variaciones en estos resultados pueden ser ocasionados por las prácticas de manejo en la rutina de ordeño, la forma como se realice la limpieza de equipos y por la frecuencia y tipo de mastitis ocasionada por agentes de tipo contagioso (Vélez, 2016). Se sostiene que las correcciones en los aspectos sanitarios, como la rutina de trabajo, chequeo de máquina de ordeño, sellado de pezón, terapia de secado, tratamiento de casos clínicos, descarte de vacas crónicas y muy en especialmente en el control de calidad de los insumos que se utilizan, contribuyen al significativo cambio en los niveles medios o altos de células somáticas por el control que se ejerce sobre los factores de riesgo que ocasionan mastitis (Revelli *et al.*, 2011).

Las pérdidas en la producción de leche pueden ser calculadas en tanques de acopio conociendo el valor del RCS. Así, por el incremento de cada 100.000 células somáticas a partir de 200.000, aproximadamente se pierde el 2% de la producción de leche total del hato (Calderón *et al.*, 2012).

Calderón *et al.* (2010), afirma que altos recuentos pueden pasar desapercibidos entre los ganaderos y asesores técnicos por falta de análisis y este aumento en el RCS produce

no solo una disminución en el volumen de producción, sino, una disminución en algunos componentes como caseína, grasa, sólidos totales y el calcio, y provoca aumento del sodio y cloro afectando los procesos de pasteurización por la liberación de enzimas que reducen la vida útil de los diferentes subproductos lácteos.

En este contexto, es importante precisar que algunos de los problemas que afectan la competitividad del sector lácteo colombiano pueden deberse a la falta de análisis y evaluación e identificación microbiológica en leche, para identificar las causas que provocan la presencia de algunos agentes y sus alteraciones entre otros factores (Moreno, 2007).

El objetivo de este proyecto fue identificar los microorganismos asociados a la calidad higiénica de la leche y el recuento de células somáticas en los tanques de leche fría de 30 hatos del Valle del Cauca y determinar si existe relación con las variables: días en leche, producción de leche, precipitación, tipo de descarga de la leche al tanque, número de vacas en ordeño, buenas prácticas ganaderas, ubicación de los hatos (m.s.n.m.), tipo de ordeño, caracterización racial, suministro de pollinaza y total de bacterias identificadas en cada muestra.

1.Marco referencial

1.1 Contexto de la Producción de Leche y su calidad.

1.1.1 Cifras Globales sobre Producción Lechera y su Importancia Económica

Según datos de FAO, (2016) la producción de leche a nivel mundial ha aumentado en más del 50% en los últimos 35 años, pasando de 500 millones de toneladas en el año 1983 a 769 millones de toneladas en el año 2014. Este comportamiento indica que la demanda de leche cada vez es mayor y más aún, si se tiene en cuenta que la población cada vez crece más, por lo que se tendrá una mayor demanda de alimentos. Según datos de IFCN (2016), la producción de leche en el año 2025 será de 1038 millones de toneladas lo que deja en evidencia el reto que se viene en cuanto a eficiencia en los hatos en sus producciones de leche. En los últimos años, los países en desarrollo han aumentado su participación en la producción lechera mundial. Este crecimiento se debe principalmente al aumento del número de animales destinados a la producción por cada hato, más que al aumento en las producciones de cada vaca. En los países en proceso de desarrollo, los factores que no han permitido mayores crecimientos en sus producciones han sido, los malos manejos y baja calidad de los recursos forrajeros, las enfermedades, el acceso limitado a mercados y servicios (p. ej., sanidad animal, crédito y capacitación), el reducido potencial genético de los animales lecheros para la producción láctea y los climas cálidos o húmedos que son desfavorables para la actividad lechera (FAO, 2016).

La india es el mayor productor mundial de leche con el 18% de la producción total, seguida por Estados Unidos, China, Pakistan y Brasil (FAO, 2016). Para Fedegan (2016), Colombia es el productor número 21 de leche a nivel mundial y el 4to en América Latina. En cuanto al consumo de leche, en Colombia se ha incrementado levemente; en el año

2010 se consumían 139,4 Lt por habitante y en el 2015 era 143 Lt por habitante presentando un incremento de 2,5 % en 5 años.

Jaramillo (2012), manifiesta que, en Colombia, en el eslabón primario se encontraban para el 2012 un total de 20.432.140 bovinos, de los cuales 2.422.531 (12%), se destinaban de forma exclusiva a la producción de leche y 7.867.534 (39%), tenían orientación al sistema doble propósito (leche y carne), logrando producciones cercanas a los 13 millones de litros de leche diarios, de éstos se destinaban un 8% al autoconsumo, 10% al procesamiento en finca y el 82% restante para la venta.

En un estudio sobre la producción de leche en Colombia, se identificó que el sector no está concentrado y que cerca del 44% de la producción nacional de leche se comercializa por canales informales, complicando la posibilidad de tener mayores controles y exigencias de mejores parámetros de calidad de la leche (Jaramillo, 2012).

En Colombia existen cuatro cuencas lecheras; la primera, es la región atlántica que incluye Cesar, Magdalena, Córdoba, Atlántico, Guajira Sucre y Bolívar con un 40% de la producción nacional equivalente a 7.123.000 Lt producidos por día. La segunda, es la región Occidental que abarca Antioquia, Caquetá, Huila, Quindío, Risaralda y Caldas con un 17% equivalente a 3.027.000 Lt. La tercera, es la región Central que se compone de Cundinamarca, Boyacá, Meta y Santanderes con un 34% equivalente a 6.055.000 Lt. Por último, está la región Pacífica que comprende Valle del Cauca, Nariño, Cauca y Alto Putumayo con un 9% que equivale a 1.602.000 Lt producidos por día según FEDEGAN (2016).

Aunque la producción de leche en el Valle del Cauca solo representa el 13,7% (220.000 Lt diarios) de lo que produce la cuenca de la región pacífica, se tienen 6.022 productores que representa igual número de familias entre lechería especializada y doble propósito que tienen como fuente de ingresos la venta de leche. Esta información demuestra la importancia y el impacto social que tiene la realización de un proyecto como éste en una zona que no es considerada alta productora de leche (FEDEGAN, 2014).

La cadena láctea en Colombia reviste vital importancia en el tema de producción de leche, no solo por ser éste un producto básico e indispensable en la alimentación humana, sino además por las connotaciones que tiene en el sector rural y urbano como

generador de empleo con 580.000 personas empleadas en la producción de leche y 17.750 personas en el procesamiento de productos lácteos (FEDEGAN, 2014).

La calidad microbiológica de la leche es un factor económico clave para las granjas lecheras en Colombia y el conocimiento de los agentes presentes en leche que ocasionan las pérdidas, permite empezar a plantear soluciones para controlar la incidencia de estos microorganismos y por consiguiente disminuir las pérdidas económicas (Azevedo *et al.*, 2015).

Cuando se habla de la leche, es un fluido biológico complejo y por su naturaleza, un buen medio de crecimiento para muchos microorganismos. Debido a la forma como se trabajan en los sistemas productivos es imposible evitar la contaminación de la leche cruda con microorganismos. Esta contaminación bacteriana puede provenir de fuentes como: aire, equipo de ordeño, alimento, suelo, heces, la pastura u otros alimentos (Coorevits *et al.*, 2008). La cantidad y tipos de microorganismos en la leche después del ordeño son afectados por factores tales como la limpieza de animales y equipos de ordeño, además de otros implementos, la alimentación y la salud animal (Rogelj, 2003). El agua empleada para el lavado del equipo de ordeño y la forma como se realiza el lavado también son factores que pueden incrementar la presencia de microorganismos en la leche (Mekibib *et al.* 2010), incluidas bacterias que pueden ser patógenos para la glándula mamaria (Torkar *et al.*, 2008). El número y tipos de microorganismos presentes en la leche inmediatamente después del ordeño también pueden ser afectados por factores tales como; la higiene de los animales y el equipo de ordeño, el clima y la salud animal. La hipótesis es que las diferentes formas de alimentación y mantenimiento de las vacas pueden afectar la calidad microbiana de la leche (Coorevits *et al.*, 2008).

En Colombia son muchos los estudios realizados identificando agentes causantes de mastitis en muestras tomadas directamente de los pezones de vacas afectadas, pero muy pocos los realizados en muestras tomadas de tanque. Pero según de Paula *et al.* (2004), una muestra de leche del tanque es aceptada internacionalmente como una medida estándar para determinar la calidad de la leche cruda, permitiendo la comprensión de la dinámica de los recuentos de células somáticas en la leche de tanque, siendo un paso importante en la mejora de la calidad de la leche de un hato. De la misma forma, con un alto recuento celular en leche de tanque se pueden calcular las pérdidas en la producción de leche; y un recuento celular bajo indica buena salud de la glándula

mamaria de las vacas del hato. Otra razón para monitorear el RCS en tanque está relacionado con la exigencia del consumidor al requerir leche con muy buenos parámetros de calidad para su consumo al igual que la necesidad del industrial por tener un producto terminado de buena calidad, además, por la presión de los mercados internacionales por acceder a productos en las mejores condiciones. de Paula *et al.* (2004), concluye que altos RCS afectan la composición de la leche y el tiempo de vida de sus derivados lácteos, causando grandes perjuicios para la industria de los lácteos, por ésta razón deben ser controlados los recuentos celulares en la leche de tanque.

Consecuentemente, la calidad de la leche cruda a nivel de finca es un componente importante que influye en el desempeño de toda la cadena lechera. Un parámetro clave de la calidad de la leche cruda es su perfil higiénico, que se caracteriza por niveles bajos de contaminación y distribución específica de microorganismos y cualquier incremento en estos valores relacionados con la calidad higiénica de la leche está influenciada por los aspectos ya mencionados que dependen del manejo en el hato (Zucali *et al.*, 2011).

Ramírez *et al.* (2012.), Cuchillo *et al.* (2010) y Deluyker *et al.* (2005), coinciden en afirmar que la calidad microbiológica de la leche es responsable de grandes pérdidas económicas en los hatos lecheros del mundo, debido a que ocasiona disminución en la calidad de la leche y en consecuencia, reduce su precio e incrementa los costos de producción del hato.

Identificando los principales agentes causales de estas contaminaciones, Rodríguez (2007), de acuerdo con Bradley (2002), menciona que se han aislado más de 135 especies de microorganismos presentes en leche de tanque en hatos productores de leche. Aunque existen numerosas especies de bacterias, hongos, levaduras, micoplasmas y virus, los géneros estafilococos y estreptococos continúan siendo responsables de más del 90% de las infecciones intramamarias. Se estima que entre el 80 y 90% de los casos de mastitis son ocasionados por la invasión de microorganismos que se encuentran en la piel de los pezones y tejidos de la ubre, causando infecciones intramamarias o simplemente contaminando la leche por fallas en el manejo con las vacas (Bradley, 2002). Por eso, las bacterias presentes en leche y que tienen hábitat normal en sistema digestivo de las vacas y en el medio ambiente indican una producción de leche con prácticas insaludables. Los coliformes también se pueden incubar en

películas residuales de un equipo de ordeño con manejo inadecuado (Elmoslemany *et al.*, 2010).

Mediante la caracterización bacteriológica de los microorganismos causantes de mastitis, estos se han clasificado tradicionalmente en contagiosos y ambientales. La distinción entre ambos grupos está basada en su comportamiento en los hatos lecheros. El patrón contagioso está caracterizado por la transmisión de vaca a vaca, mientras que el patrón ambiental está caracterizado por una transmisión del medio ambiente a la vaca (Schukken *et al.*, 2010).

Cotrino (2010), en un estudio realizado en la cuenca lechera del altiplano Cundiboyancense donde realizaron varios muestreos durante períodos prolongados desde el año 1980 concluyó que de 3.891 muestras donde arrojaron como resultado: 66% de patógenos de tipo contagioso y de éste el 26,1% tenían su origen en la piel de los pezones, lo que permite concluir que se presentaron fallas en los procedimientos de limpieza durante la preparación al ordeño y por lo tanto esta contaminación se evidencia en tanques de almacenamiento de leche fría. Este análisis termina con la evaluación del período 1999 a 2003 y sus resultados fueron un aporte importante para lograr el mejoramiento de la calidad bacteriológica de la leche, debido al interés de los procesadores por adquirir leche de buena calidad. En 1998, el laboratorio médico veterinario LMV Ltda. implementó la técnica de recuento de células somáticas (RCS) con un contador electrónico, y por primera vez en Colombia se usa este parámetro en leche de tanque como indicador de sanidad de la ubre y de las pérdidas por disminución en la producción de leche. Un año después, en otro trabajo de investigación, se examinaron 1.100 muestras. En promedio esas fincas tenían un RCS de 637.000/ml, al cual se le puede asignar una disminución en producción del 15%, que para estos productores representaba entregar 111.004 litros de leche menos al día, según lo reporta Cotrino (2010).

Por otro lado, Calderón *et al.* (2010), menciona que el aumento del recuento de células somáticas produce una disminución en el volumen de producción y en varios componentes como caseína, grasa, sólidos totales y el calcio, afectando los procesos de pasteurización por la liberación de enzimas que reducen la vida útil de los diferentes subproductos lácteos. Consecuentemente, estos problemas afectan la competitividad del

sector lácteo colombiano y son la consecuencia de las malas prácticas durante la rutina de ordeño (Moreno, 2007).

También se resalta que los análisis de células somáticas son una manera indirecta de medir la sanidad de la glándula mamaria (Reneau *et al.* 2007). Relacionado con las pérdidas, keefe (2010), menciona que las pérdidas en la producción de leche pueden ser calculadas en tanques de acopio conociendo el valor del RCS. Según Wolter *et al.* (2004), las pérdidas causadas por altos recuentos celulares (cuando se presenta infección) se clasifican como sigue:

1. Pérdida por baja producción del animal enfermo.
2. Pérdida de producción de leche por desecho de la misma, durante la eliminación del medicamento.
3. Frecuentemente hay un perjuicio duradero en el rendimiento lechero de la vaca, por el uso de medicamentos o la presencia de la enfermedad.
4. Costos de medicamentos y servicios veterinarios.
5. Aumento en los costos de la mano de obra.

Vásquez *et al.* (2012) menciona que la importancia que tiene el conocimiento del recuento de células somáticas es porque los altos recuentos en leche cruda incrementan la actividad enzimática lipolítica y proteolítica, lo cual afecta las características sensoriales de la leche con sabores rancios o picantes, al tiempo que afectan la calidad de la caseína y por tanto, el rendimiento quesero. En contraste, bajos RCS han sido relacionados con mayor producción lechera y mejor calidad de derivados lácteos. Otro uso que tiene el análisis del recuento de células somáticas es la posibilidad de calcular la reducción en la producción de leche asociada a la mastitis (Vásquez *et al.*, 2011).

Para dar claridad sobre los aspectos que provocan los incrementos, Schukeen *et al.* (2003) y Ramírez *et al.* (2009), mencionan que el 80% del RCS en un cuarto no infectado son células del sistema inmune y el 99% en los cuartos infectados. Estas células somáticas son parte del mecanismo de defensa natural que tienen la función de eliminar las bacterias, y cuando la infección se elimina, por lo general en 4 semanas, el recuento de células en leche vuelve a la normalidad. Por lo tanto, las células somáticas son un

reflejo de la respuesta inflamatoria a una infección intramamaria u otro factor desencadenante del sistema inmunológico más que a la respuesta fisiológica de la glándula mamaria ocurrida por descamación de células epiteliales.

Por eso, el RCS se utiliza a menudo para distinguir entre cuartos infectados y no infectados (Mira *et al.*, 2013). Pero como con cualquier prueba de diagnóstico, los errores se producen cuando sólo se dependen de una sola prueba. Para minimizar la cantidad de error, Suriyasathaporn *et al.* (2010), menciona que los parámetros de la prueba diagnóstica, tales como la sensibilidad y la especificidad, se calculan en varios valores (muestras) continuos del RCS. Investigaciones de América del Norte y Europa han demostrado que los cuartos no infectados tienen un RCS medio de aproximadamente 70.000 células/ml. Por supuesto, hay variación alrededor de esta media, y también se demostró que la media de RCS de los cuartos no infectados aumenta con la edad, cuando disminuye la producción de leche y cuando aumentan los días en leche (Schukeen *et al.*, 2003 y Gibson *et al.*, 2008). Por lo tanto, para poder distinguir entre cuartos infectados y no infectados, se demostró repetidamente que un corte de aproximadamente 200.000 a 250.000 células era óptimo para reducir el error de diagnóstico. A este valor de corte, se demostró que la sensibilidad diagnóstica era aproximadamente el 75%, mientras que la especificidad era de aproximadamente el 90%. Mira *et al.* (2013), menciona que el límite de 200.000 células/ml no se considera una concentración de células fisiológicas en la leche que distingue a una vaca "saludable" o de los cuartos o ubres enfermas, sino que es un umbral operacional de valor práctico en condiciones de campo (minimizando el error de diagnóstico). Otros umbrales como 100.000 o 500.000 células/ml son defendidos por otros autores, pero cualquier umbral de recuento de células para indicar la infección intramamaria tendrá sus ventajas y desventajas por las condiciones fisiológicas que deben ser tenidas en cuenta (Schukeen *et al.*, 2003).

El seguimiento de los recuentos de células somáticas a nivel de hato requiere seguir las tendencias a través del tiempo cuando el recuento de células parece aumentar por encima de un determinado umbral, dada la variabilidad en las respuestas inflamatorias entre todas las vacas que lo componen. Por lo tanto, la media de un RCS en leche de tanque de 50.000 células/ml no es un objetivo realista (Curbelo, 2007). Por ejemplo, cuando los recuentos de células de un rebaño se muestran durante aproximadamente tres años y el RCS de leche del tanque de un hato es de aproximadamente 200.000

células/ml, con una desviación estándar de aproximadamente 35.000 células/ml. Utilizando algoritmos de control de procesos, se pueden calcular los límites de confianza del 95% alrededor de una media dada, las observaciones fuera de estos intervalos representarían verdaderas desviaciones de la situación de salud de la ubre (Schukeen *et al.*, 2003).

Para el Valle del Cauca no se tienen históricos sobre el comportamiento del RCS, pero queda en evidencia la importancia de realizar estos análisis de forma permanente en los hatos lecheros del Valle del Cauca y Colombia. Para realizar estos análisis se debe tener en cuenta los parámetros establecidos para considerar hatos sanos y hatos infectados, y para esto se tienen varias formas de clasificar los resultados de los análisis de células somáticas enfocados a determinar si el hato presenta recuentos celulares con valores que demuestren que las vacas están sanas, con inicio de infección o ya infectadas.

Para interpretar adecuadamente el resultado del RCS de un hato, se mencionan tres posibilidades de agrupamiento. Inicialmente se plantea un agrupamiento propuesto por Jayarao *et al.* (2004), además de otros dos métodos sugeridos por el National Mastitis Council (NMC) (2001 y 2006).

La primera forma de clasificar las células somáticas es propuesta por Jayarao *et al.* (2004). Esta clasificación tiene un primer rango bajo $<$ a 200.000 células/ml, rango medio de 200.000 a 400.000 células/ml y un rango alto $>$ a 400.000 células/ml. El objetivo de esta clasificación fue determinar si los animales estaban sanos, iniciando un proceso infeccioso o si tenían desarrollada la infección en glándula mamaria. Riekerink *et al.* (2005), afirma que un recuento de células somáticas superior 400.000 células/ml es indicativo del inicio de un proceso infeccioso independiente del estado de lactancia en el que se encuentre la vaca.

Otra clasificación similar ya había sido propuesta por el NMC (2001) comprendiendo 5 grupos, teniendo primer agrupamiento con recuentos menores a 150.000 células/ml, luego entre 150.000 y 250.000 células/ml, posteriormente un agrupamiento entre 250.000 y 400.000 y por último los recuentos superiores a 400.000 células/ml. Este método permite mostrar si los hatos objeto del estudio estaban sanos o tenían recuentos que evidenciaban inicio de procesos infecciosos de acuerdo a la clasificación sugerida por el NMC (2001), así: \leq 150.000 es ideal; entre 150.000 y 250.000 es bueno; entre 250.000 y 400.000 requiere iniciar con un programa para mejorar la calidad de la leche y $>$

400.000 células/ml tiene problemas con la mastitis, siendo indispensable realizar un diagnóstico integral para determinar las causas que están provocando el incremento en el recuento celular (Azevedo *et al.*, 2015).

Una tercera forma de agrupar los recuentos de células somáticas es la propuesta por el NMC 2006 donde clasifica los valores en 10 categorías, asignando una clasificación lineal de acuerdo al rango del RCS, según como se muestra en la tabla N° 1. Coldebella *et al.* (2004), menciona que la clasificación lineal (CL) tiene un comportamiento lineal, lo que no se da cuando se analiza el RCS. Esta forma de análisis tiene importancia para la industria láctea porque puede llegar a ser el parámetro estipulado para fijar las bonificaciones por calidad y también establecer el castigo por no cumplir con parámetros adecuados de calidad láctea. Por ejemplo, según de Paula *et al.* (2004), para los hatos lecheros de Estados Unidos y Canadá tienen como meta tener el 80% de sus hatos con una clasificación lineal inferior a 3.

Tabla 1-1. Relación entre la clasificación lineal de células somáticas y el recuento de células somáticas.

Clasificación lineal	Punto medio RCS (1000's /ml)	Rango
0	12,5	0 - 17
1	25	18 - 34
2	50	35 - 70
3	100	71 - 140
4	200	141 - 282
5	400	283 - 565
6	800	566 - 1130
7	1600	1.131 - 2.262
8	3200	2.263 - 4.525
9	6400	> 4.526

Según Galán (2008), las ventajas de emplear la clasificación lineal radican en la existencia de una relación directa de éste con la producción de leche así; por cada punto que incremente la clasificación a partir de 3, la pérdida en producción de leche es de aproximadamente 200 litros por lactancia. Por otro lado, Coldebella *et al.* (2004), menciona que a partir de 17.000 células somáticas ya se tienen pérdidas en las producciones de leche y con la clasificación lineal se podría calcular más fácilmente por el agrupamiento realizado con bajos valores lo que no sucede con otras formas de agrupación. Adicionalmente, la clasificación tiene un comportamiento lineal, lo que no se da cuando se analiza el RCS. Para el caso de análisis de muestras de tanque en el análisis y la interpretación el error es menor si se analiza con la CL. Esto se explica porque un RCS individual elevado no coincide con un análisis general de una muestra de tanque, lo que no ocurre con la CL del RCS.

Por otro lado, los patógenos de la glándula mamaria pueden ser listados de diferentes formas o en diferentes grupos: mayores o menores, contagiosos o ambientales (Howard, 2006). Los mayores *Streptococcus uberis*, *Streptococcus bovis*, enterococos, coliformes, *Pseudomonas spp.*, y *Arcanobacterium pyogenes* son clasificados también como ambientales. El *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus intermedius* y *Mycoplasma bovis* son clasificados como infecciosos Azevedo *et al.* (2015). La importancia de conocer estos microorganismos infecciosos mayores es porque cuando están en glándula mamaria producen un gran incremento en los recuentos de células somáticas (Farias *et al.*, 2005). Otra forma de agrupar son los *Staphylococcus coagulasa positivo* (SCP), de este grupo el más importante es *S. aureus*, su importancia radica en que no es un microorganismo obligado de la ubre, se puede encontrar también en las lesiones de la piel de los pezones, en las manos de los ordeñadores, en las camas, en los equipos de ordeño y dependiendo de las prácticas de manejo este agente etiológico puede alcanzar el conducto del pezón, produciendo una reacción inflamatoria (Benhamed *et al.*, 2013). Esto demuestra que este tipo de población microbiana al ser encontrada en leches de tanque, puede llegar a tener su origen en partes diferentes a la glándula mamaria, indicando contaminación bacteriana. Otro grupo son los *Staphylococcus coagulasa negativo* (SCN) que comprenden el *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus warnery* y *Staphylococcus epidermidis*, que hacen parte de la flora normal de la piel de los pezones y usualmente pueden ocasionar formas subclínicas de mastitis (Andrade *et*

al., 2014). Otras bacterias habitantes normales del ambiente, clasificados como Gram-positivos y Gram-negativos, que pueden estar presentes en leche de tanque, por ejemplo: *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp, *Serratia* spp, *Pseudomonas* spp y *Proteus* spp que son habitantes normales del tracto digestivo de los animales o se encuentran en el suelo. Andrade *et al.* (2014), coincide en afirmar que los principales Gram-positivos incluyen: *Streptococcus uberis* y *Streptococcus dysgalactiae*. Estos dos microorganismos se han aislado de las heces, de los genitales externos, de las ubres y de lesiones de la piel de los pezones de las vacas.

Keefe (2010), menciona lo difícil y complejo que puede ser controlar la presencia de los diferentes microorganismos en leche porque pueden tener su origen en el ambiente o en el interior de la ubre, por lo que se hace necesario hacer énfasis en las medidas de control en el hato para la disminución en la presentación de estas bacterias. Riekerink *et al.* (2010) y Leelahapongsathon *et al.* (2014), coinciden al afirmar que la información relacionada con las prevalencias de las bacterias presentes en tanques de almacenamiento de leche son cruciales para la identificación de los factores de riesgo, las fuentes de contaminación y la prevención de la enfermedad. Ramírez *et al.* (2009), concluye que a pesar del gran volumen de información surgida en los últimos años sobre el problema de contaminación en leche de tanque y la mastitis bovina a nivel mundial y su prevención, todavía se tienen gran presencia de estas bacterias y altos recuentos celulares que indican la presencia de la enfermedad con valores superiores a los exigidos por las normas internacionales.

1.2 Descripción de principales microorganismos encontrados en tanque de almacenamiento de leche

1.2.1 Microorganismos ambientales

Algunas bacterias ambientales como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter*, *Bacilos* y *Enterobacter aerogenes*, son bacterias Gram-negativas habitantes normales del tracto digestivo de los animales o que se encuentran en el suelo, con una alta probabilidad de estar presentes en leches de tanque cuando se tienen prácticas inadecuadas durante el ordeño, de la misma forma se tiene la posibilidad de producir mastitis si la higiene no es la adecuada (Calderón & Rodríguez, 2009). Ahora se mencionan las más representativas:

- **Bacilos Gram-negativos**

Muchas especies de bacilos aerobios han sido identificados y clasificados, pero son de poca importancia como agentes causales de infección en glándula mamaria. Muchas especies se consideran no patógenas, aunque están ampliamente distribuidos en la naturaleza encontrándose en el suelo, el agua, en el aire, las heces y la vegetación. Estos *bacilos* tienen un bajo impacto sobre los recuentos de células somáticas, pero son de gran importancia para los lácteos por la descomposición de leche pasteurizada (González, 1996). Estos microorganismos se pueden encontrar por: 1) Estar presente en el canal del pezón y no se realiza un adecuado despunte al inicio del ordeño; 2) Contaminación de algunos elementos como maneas y otros utensilios utilizados en el momento del ordeño; y 3) Falta de higiene durante la preparación de la vaca para el ordeño. Los *bacilos* se han identificado como causa poco frecuente de mastitis y algunos casos han sucedido durante la introducción de cánulas con antibiótico cuando se realizan los tratamientos intramamarios, pero sucede en más ocasiones por la contaminación de la leche posterior al ordeño (González, 1996).

- ***Streptococcus* spp.**

Son cocos Gram-positivos similares al *S. agalactiae*, que se encuentran en el ambiente y también en el tracto intestinal. Son de frecuente presentación en el período seco, pero por manejos inadecuados, especialmente en la rutina de ordeño puede aparecer durante la lactancia (Ramírez, 2013).

Jones & Bailey (2009), mencionan que cerca del 50% de las infecciones por *Streptococcus* ambientales pueden mostrar síntomas clínicos y 60 a 70% de éstas infecciones persisten por menos de 30 días. Estas infecciones no son detectadas fácilmente causando grandes pérdidas económicas por la infección subclínica y por el alto recuento de células somáticas (Jones & Bailey, 2009). En la actualidad se reconocen aproximadamente 30 especies de *Streptococcus* (Zárate, 2012).

Los *streptococcus* spp. están ampliamente distribuidos en el medio ambiente en donde permanece la vaca, en la punta y la piel del pezón y, en las heces. Este patógeno puede acceder a la glándula mamaria a través del esfínter e inducir cambios en el tejido mamario. En el estudio realizado por Jayarao *et al.* (2004), los productores de leche que practicaban el presellado y el sellado post-ordeño tenían significativamente menores

bacterias en su tanque en comparación con los productores de leche que no practicaban la inmersión de los pezones, básicamente porque lograban la eliminación de los microorganismos que se encontraban en la piel y esfínter del pezón, además de tener mayor protección del esfínter.

- ***Staphylococcus coagulasa negativos (SCN)***

Son bacterias Gram-positivas que han sido descritas como microorganismos oportunistas haciendo parte de la flora normal de la piel de los pezones, pero rara vez ocasionan la forma clínica de la enfermedad y su incidencia sobre células somáticas es muy baja (Vásquez *et al.*, 2011; Calderón & Rodríguez, 2009). Pero, Le Maréchal *et al.* (2011), afirma que los SCN al entrar por el canal del pezón y alojarse allí, también pueden producir proteasas que son capaces de degradar la caseína y alterar los componentes de la leche causando pérdidas para la industria.

Los pocos casos de mastitis producidas por ésta bacteria son difíciles de controlar con sólo recurrir al tratamiento, por eso, el control exitoso se logra mediante medidas preventivas, especialmente en las vacas recién paridas donde las vacas están más predispuestas y pueden llegar a adquirir una infección crónica subclínica (Zárate, 2012). Estas bacterias pueden vivir sobre la piel sana de los pezones y manos del ordeñador y puede infectar a vaquillonas antes de su primer parto (Espinoza & Mier, 2013).

El aumento de esta bacteria en el tanque, también puede resultar de una mala desinfección de los pezones post-ordeño (Blowey, 2010).

- ***Citrobacter spp.***

Es una enterobacteria que puede ser aislada de infecciones intramamarias en vacas. Anteriormente era clasificada como *E. coli freundii* y actualmente presenta tres subespecies. Se calcula que un 17% de las infecciones intramamarias causadas por *bacilos* aerobios Gram-negativos, son producidas por este patógeno (Watts, 1988). Es considerada una de las bacterias ambientales y sus infecciones son generalmente de corta duración en comparación con los microorganismos contagiosos. Su influencia sobre el RCS en tanque es baja (Smith & Hogan, 2008).

- ***Enterobacter spp.***

Son bacterias Gram-negativas, habitantes normales del tracto gastrointestinal de los mamíferos. Es considerado una bacteria ambiental y su presencia en leche está dada básicamente por contaminación casi siempre durante el ordeño, porque en glándula mamaria no sobrevive. No reviste gran importancia para las lecherías como causante de mastitis, pero debido al impacto en salud pública pueden constituirse en una barrera para el comercio internacional, aunque no están contempladas en el sistema de vigilancia en la producción primaria, pero pueden llegar al tanque de leche y posteriormente llegar al consumidor cuando se emplea leche cruda para la elaboración de subproductos (Patiño, 2012).

- ***Streptococcus uberis***

Es una bacteria Gram-positiva clasificada como patógeno medio ambiental (Sayed *et al.*, 2009), es un agente involucrado en los casos de mastitis subclínica y clínica durante el período de lactación temprana y el período seco cuando no se tienen buenas prácticas de ordeño, además es responsable del 12 a 14% de la mastitis clínica en vacas lactantes en el mundo (Calvino, 2012).

- **Bacilos Gram-positivos**

Existen dos especies de *Bacilos* asociados con mastitis: *B. cereus* y *B. licheniformis*, pero son de poca importancia porque no afectan significativamente el RCS (González, 1996), pero se debe tener cuidado al tomarse los muestreos, porque las especies de *Bacilos* también pueden ser un contaminante del pezón sin estar asociado con la mastitis. Los *B. Cereus* se pueden encontrar en los granos cerveceros infectados y pueden llegar a producir una mastitis aguda gangrenosa. También se pueden encontrar en jeringas contaminadas usadas para tratamientos intramamarios. Por otro lado, los *B. licheniformis* son organismos del medio ambiente a la que las vacas son particularmente vulnerables. Se encuentran en el ensilaje, los comederos y las camas. Sus infecciones son ascendentes a la vagina ocasionando problemas reproductivos (Blowey & Edmondson, 2010).

- ***Proteus spp.***

Este microorganismo pertenece al grupo de las bacterias ambientales representando un grupo muy grande de organismos que están presentes en los entornos de las vacas y que puede infectar directamente las vacas o contaminar los productos colocados directamente en los pezones. A este grupo también pertenecen: *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Pseudomonas spp.* y *Citrobacter spp.* (Smith & Hogan, 2008). Por su parte, Watts (1988), menciona que los *Proteus* al igual que *Klebsiella*, *Citrobacter* y las enterobacterias son la población bacteriana más frecuentemente aislados de los tanques de almacenamiento y de glándula mamaria de los bovinos cuando las condiciones de higiene y manejo con las vacas no son las apropiadas.

- ***Pseudomona spp.***

Son bacilos Gram-negativos, incapaces de formar esporas y crecen aeróbicamente. Se encuentra en forma saprófita tanto en suelos como el aire, pero su principal fuente de contaminación es a través de las aguas residuales utilizadas en la sala de ordeño para el lavado de equipos y limpieza de pezones (Pieterse & Todorov, 2010).

Este patógeno es considerado ambiental y puede permanecer en estado latente y puede llegar a estar presente en tanques de almacenamiento por malas prácticas de manejo, así como ocasionar mastitis de tipo agudo, subagudo y agudo sistemático (Zárate, 2012). Se atribuyen los casos de mastitis por este patógeno a aguas contaminadas y malos métodos de tratamiento para la mastitis (Espinoza & Mier, 2013). Se considera que un bajo porcentaje de las infecciones en glándula mamaria, son causadas por *Pseudomonas* y de éstas la cepa identificada comúnmente es la *Pseudomona auroginosa* (Watts, 1988).

- ***Klebsiella spp.***

Es una bacteria Gram-negativa que puede estar en el ambiente y es relacionada con algunos casos de infección en glándula mamaria en vacas lecheras. Su principal reservorio son las camas de madera que utilizan los sistemas estabulados en sus granjas lecheras y la principal forma de controlarla es a través de la higiene medio ambiental y el uso de camas con materiales inorgánicos tales como la arena. La infección causada por éste agente puede ser particularmente grave debido a su escasa respuesta al tratamiento con antibióticos y la rápida evolución de shock tóxico y la muerte (Zárate, 2012). Algunas

veces este patógeno puede causar una infección crónica estando presente por varios meses en la glándula mamaria (Smith & Hogan, 2008).

- ***Streptococcus dysgalactiae***

Esta bacteria, al igual que el *Streptococcus uberis* se encuentra en la piel de la vaca y se transmiten del ambiente al pezón, la mayoría de las veces durante el ordeño. Este patógeno es posible encontrarlo en tanques de almacenamiento por falta de higiene y puede llegar a causar un tipo de mastitis altamente variable, que puede ser subclínica y altamente contagiosa. Duica, 2004, citado por Cuchillo *et al.* (2010), menciona que éste microorganismo puede permanecer en el ambiente, debido a ello es considerada una especie que puede ser clasificada como ambiental pero también como infecciosa.

- ***Escherichia coli***

Ésta es una bacteria Gram-negativa y clasificada como un patógeno de tipo ambiental. Aproximadamente el 70% de las infecciones por coliformes manifiestan síntomas clínicos en glándula mamaria, siendo de mayor presentación en los sistemas productivos estabulados (Jones & Bailey, 2009). Su prevalencia puede llegar a ser alta en sistemas confinados causando inflamaciones en la ubre, fiebres en la vaca y cambios en la leche. El tratamiento es básicamente sintomático porque éste patógeno solo dura algunas horas en glándula mamaria (Mitterhuemer *et al.*, 2010). Esta bacteria también puede tener un efecto directo sobre el incremento de las células somáticas (Günther *et al.*, 2009); diferente a lo reportado por Patiño (2012), donde concluyó en un estudio que el recuento de células somáticas no se encontró asociado a la presencia o ausencia de *E. coli*.

La infección con estos gérmenes se produce por una falla en las medidas profilácticas antes, durante y después del ordeño, así como también fallas en la aplicación de medicamentos intramamarios durante la lactancia o la terapia de vaca seca (Calderón & Rodríguez, 2009). No todas las cepas de *E. coli* poseen un potencial patogénico, sin embargo, su hallazgo en muestras de leche cruda puede estar relacionado con la contaminación de origen fecal (Molineri *et al.*, 2009).

1.2.2 Microorganismos infecciosos.

El principal reservorio de los microorganismos infecciosos o contagiosos productores de mastitis son los cuartos mamarios infectados, desde donde la infección se disemina entre vacas o entre cuartos durante el ordeño, aunque se pueden encontrar en la piel de los pezones o manos de los ordeñadores. Las medidas de control para éstos están focalizadas en la aplicación de prácticas higiénicas durante el ordeño, básicamente desinfección de pezones post-ordeño, junto con la terapia de vaca seca, lavado y desinfección de los equipos de ordeño (Valero *et al.*, 2010).

- ***Staphylococcus aureus***

Son bacterias Gram-positivas, anaerobias facultativas. La mastitis causada por las bacterias del género *Staphylococcus* es de distribución mundial según Vázquez *et al.* (2007) y tiene inicio a través del canal del pezón variando el curso desde subclínico a agudo supurativo, gangrenoso o crónico, dependiendo de la cepa infectante, dosis infectante y resistencia del hospedador. Su ubicación es en el epitelio mamario y tejido alveolar donde persiste intracelularmente (Camussone *et al.*, 2013). La completa eliminación o tratamiento se dificulta por la capacidad de encapsularse o formar nódulos en el tejido mamario que contribuyen a la resistencia de ésta bacteria frente a los antibióticos (Lutzowet *et al.*, 2008). Por otro lado, Hancock *et al.* (2012), menciona que la particularidad que posee el *S. aureus* es la capacidad de producir bio-film protegiéndolo de los antibióticos y también porque produce polisacáridos capsulares durante las infecciones intramamarias que confieren resistencia a la fagocitosis por neutrófilos polimorfonucleares (PMN). Este agente patógeno también tiene su habitat en las superficies corporales de los animales y de las manos de los ordeñadores, así como de utensilios usados durante el ordeño, por lo que es posible una identificación de éste patógeno en leche de tanque sin que éste provenga de glándula mamaria (Katholm *et al.*, 2012).

- ***Streptococcus agalactiae***

Los *S. agalactiae* son bacterias Gram-positivas altamente contagiosas de la glándula mamaria bovina que provocan un gran incremento en el recuento de células somáticas (Riekerink *et al.*, 2006). Pertenecen al grupo de los *Streptococcus hemolíticos*. Por lo

general, provoca una infección persistente, pero leve, respondiendo fácilmente a los tratamientos por lo que es posible llegar a erradicar de las explotaciones lecheras (Vélez, 2016). La transmisión se da principalmente de vaca a vaca durante el ordeño por falta de higiene durante el ordeño. Sin embargo, en estudio reportado por Jørgensen *et al.* (2016), se encontró que el tracto gastrointestinal era reservorio de *S. agalactiae* por lo que se debe tener en cuenta otra forma de contaminación que es oral – fecal a través del agua de bebida. El *Streptococcus agalactiae* es una bacteria parásita de la ubre; es decir, que depende de la ubre para sobrevivir. Fuera de ella, en el medio ambiente, no puede mantenerse por mucho tiempo. Otra característica de éste patógeno es que vive en los conductos galactóforos, lo que permite que sea alcanzado por los antibióticos en los tratamientos intramamarios fácilmente (Ortiz, 2014).

Por otro lado, cuando la intención es mejorar indicadores de calidad de la leche como el RCS, Riekerink *et al.* (2007), demostraron la importancia de los cultivos de leche y la diferenciación de las bacterias provenientes del ambiente y los que pueden tener su origen en glándula mamaria para hacer recomendaciones específicas en los programas de control de la salud de la ubre. Para realizar éste diagnóstico, Riekerink *et al.* (2010), menciona que los muestreos de las leches de tanques son un método seguro y efectivo para la evaluación de la calidad de la leche a nivel de hato y a su vez permite identificar las bacterias presentes en las vacas clínicamente afectadas por la mastitis, teniendo en cuenta todas las condiciones de higiene al momento de la toma de la muestra. Sin embargo, a pesar de tener estas posibilidades, Keefe (2010), menciona lo difícil y complejo que puede ser tratar la mastitis de acuerdo a los resultados de las muestras de tanque, por lo que se hace necesario hacer énfasis en las medidas de control en el hato para la disminución de ésta enfermedad y hacer diagnóstico individual directamente de la ubre para evitar contaminaciones en las muestras de leche.

En el mundo, la importancia de los programas de salud de la ubre han aumentado en los últimos diez años (Curbelo, 2007). En Europa, la directiva desde abril de 1992 estableció que la leche con un recuento de células somáticas de más de 400.000 células/ml no podía utilizarse para procesos industriales. Para el año de 1998 ni siquiera serviría para el consumo humano. En América del Norte el acopio de leche por parte de la industrial está en 750.000 y de 500.000 células/ml para Canadá. Otra razón para implementar los programas de salud de ubre son la concientización de los industriales y los consumidores

con respecto al bienestar de los animales y la calidad de leche que se le ofrece a toda la población que consumen leche Schukken et al. (2003).

Las plantas que acopian la leche en Brasil, implementaron un programa de incentivos o bonificaciones para las leches con buenos prámetros de calidad, donde se incrementa la bonificación en la medida que mejora el indicador (RCS) y ésta medida ha sido adoptada también por los queseros (Barbano et al. 2006).

2. Metodología

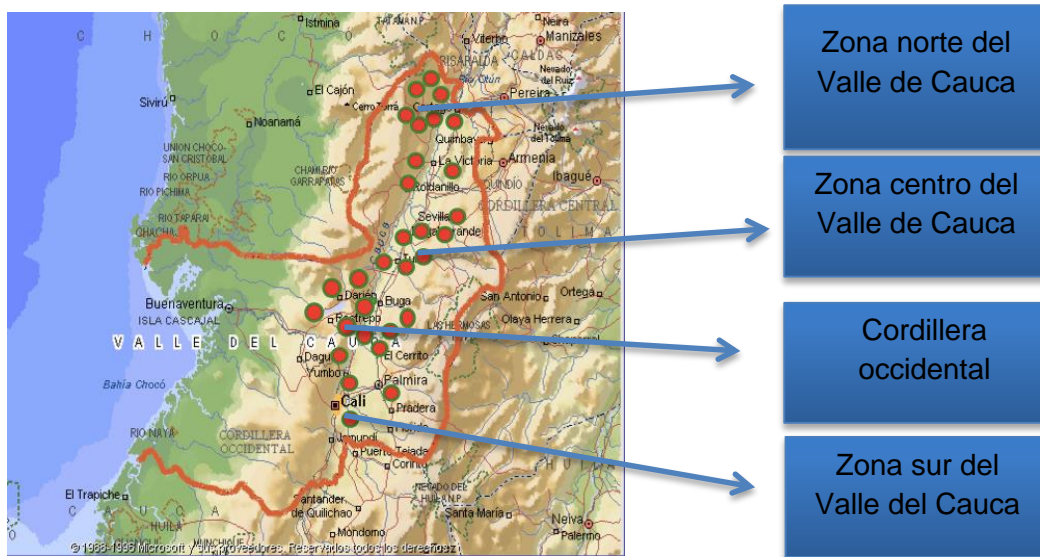
2.1 Descripción de las variables consideradas en el trabajo para asociar a los resultados del RCS y la presencia de bacterias de tipo infeccioso.

Las variaciones que se puedan presentar en los resultados de células somáticas y la presencia de las diferentes bacterias, deben tener una causa demostrable y en este proyecto se relacionaron las variables que se consideraron podían tener algún impacto sobre estos resultados. A continuación se describen las 11 variables relacionadas:

2.1.1 Variable Nº 1 Ubicación

El muestreo se realizó en el departamento del Valle del Cauca, en las zonas donde se encuentran ubicados las cuencas lecheras del Valle, siendo la zona norte, centro y sobre la cordillera occidental como se muestra en la figura 2.1. De esta forma, bajo muestreo selectivo se tiene conocimiento de lo que está pasando en todo el departamento relacionado con el RCS y los microorganismos. Fueron seleccionados 30 hatos lecheros, ubicados en zona plana (900 m.s.n.m) y otros hatos estaban a una altura de 1500 a 1800 m.s.n.m. De acuerdo a la ubicación fueron agrupados para conocer si ésta variación estaba relacionada con los resultados del RCS y con los microorganismos infecciosos.

Figura 2-1. Mapa del Valle de Cauca y la ubicación de hatos



2.1.2 Variable N° 2, Precipitación

Según se reporta en la literatura, en épocas de mayor precipitación (invierno) se tienen mayores RCS por presentar mayor contaminación por efecto de la lluvia sobre caminos, áreas de espera de las vacas, corrales, etc. dejando en mayor riesgo a la glándula mamaria por la contaminación con barro. Igualmente, se presenta mayor contaminación en la sala de ordeño y en el agua empleada para el lavado del equipo de ordeño, teniendo como consecuencias mayor contaminación en sala de ordeño y por consiguiente, mayor probabilidad de contaminación en la leche de tanque. Para éste estudio se quiso saber si las variaciones en el RCS estuvieron relacionadas con los cambios en las precipitaciones o si por el contrario no influenciaron los resultados.

Las muestras se colectaron en cuatro períodos comprendidos entre junio y diciembre de 2015 con el propósito de evaluar los meses de menor precipitación (julio y agosto) y comparar con los meses de mayor precipitación según los históricos reportados por cenicaña (octubre y noviembre), igualmente la evaluación en los períodos de transición (junio y septiembre) y cada período se relacionó con la precipitación reportada por la estación meteorológica de Cenicaña más cercana al hato objetivo del muestreo. En total, se utilizó la información de 5 de las 35 estaciones que tiene Cenicaña en el Valle del Cauca.

2.1.3 Variable N° 3, Tipo de descarga de la leche (directo a tanque o a cantina)

Se asume que cuando la leche no va directamente al tanque de enfriamiento y tiene descarga a cantina, se tiene una mayor posibilidad de contaminación con bacterias ambientales. Bajo esta premisa, se quiso evaluar si los hatos con descarga de leche a cantina y posteriormente a tanque de enfriamiento, presentaban mayor contaminación que los hatos con descarga de leche directamente a tanque.

2.1.4 Variable N° 4, Número de vacas en ordeño

Ésta variable se consideró importante porque en la medida que el número de vacas aumenta, las condiciones de manejo al interior de la sala de ordeño, por tránsito de animales, riesgos epidemiológicos por la mayor cantidad de vacas ordeñadas, mayores tiempos de ordeño, manejo en la sala de espera, entre otras, son un factor de riesgo para la contaminación de la leche durante el ordeño y también se tiene una mayor posibilidad de tener infección en las vacas.

2.1.5 Variable N° 5, Certificación en Buenas Prácticas Ganaderas (BPG)

Otra situación que se considera puede influenciar los resultados de los RCS y la presencia de microorganismos en tanques de leche, es el hecho de tener hatos certificados en BPG asumiendo que estos hatos tienen todos los procesos estandarizados y bajo protocolos escritos, donde se asume se deben cumplir diariamente. Para este caso se agruparon los resultados considerando si tenían certificación o no en buenas prácticas ganaderas.

2.1.6 Variable N° 6, Tipo de ordeño

Siempre se ha mencionado que las condiciones higiénicas en los ordeños manuales no son iguales a la que tienen los ordeños mecánicos y esto podría ser una de las causas que ocasione altas contaminaciones en leche. Por eso, para este estudio se agruparon los resultados de acuerdo al tipo de ordeño que se tenía (manual o mecánico).

2.1.7 Variable N° 7, Caracterización racial

Dependiendo el porcentaje de inclusión de razas europeas. Por las condiciones de trópico presentadas en la zona donde se realizó el estudio, un alto porcentaje de las vacas tienen un alto mestizaje y se quiso evaluar si ésta condición afectaba los resultados de las células somáticas de manera significativa. Para ésta variable se agruparon los predios de la siguiente manera:

- Mayor a 50 % de *Bos taurus*.
- Mayor o igual a 50 % de *Bos indicus*

2.1.8 Variable N° 8, Producción de leche

Esta variable fue tomada en cuenta porque se quiso saber si los hatos con mayor cantidad de leche producida, tienen mayor riesgo de contaminación o si la dificultad para homogenizar la leche de tanque o el manejo de la temperatura predispone la presencia de bacterias infecciosas y a su vez determinar si existe relación con el RCS o si guarda relación con el número de vacas.

2.1.9 Variable N° 9, Días en leche

De acuerdo a lo planteado por Keef (2010), las células somáticas pueden estar aumentadas en una baja proporción por la descamación del tejido glandular, como consecuencia de lactancias avanzadas. En este estudio se quiso evaluar si los días en leche afectan significativamente la clasificación lineal de células somáticas. Para esto, se comparó la clasificación lineal con los días en leche, en dos momentos al inicio y final de los períodos de las tomas de muestras (junio y diciembre).

2.1.10 Variable N° 10, Suministro de pollinaza

Se ha sugerido que los hatos que suministran pollinaza a las vacas (como fuente de alimentación), tienen una mayor probabilidad de tener contaminación de la leche con bacterias de tipo ambiental, por la recirculación que tendrían estos microorganismos en las áreas donde se realiza el ordeño, por causa de la manipulación que ésta requiere justo en el momento del ordeño. Por esta razón se clasificaron los hatos que suministraban pollinaza al momento del ordeño y se compararon con los hatos que no la

suministraban, con el propósito de determinar si ésta práctica incide en la presentación de las bacterias en la leche del tanque.

2.1.11 Variable N° 11, Total de bacterias identificadas por muestra

Se asume que las muestras de tanque que contienen una mayor cantidad de bacterias pueden llegar a tener un mayor recuento de células somáticas o un mayor valor en la clasificación lineal, asumiendo que algunas de estas bacterias pueden tener su origen en glándula mamaria y por lo tanto estimular la presencia de células somáticas en la ubre. De acuerdo a esto se quiso saber si estas muestras de tanque con mayor cantidad de bacterias evidentemente presentaban una asociación directa con una alta clasificación lineal de células somáticas.

2.2 Procedimiento para la toma de muestras

Para la toma de muestras del tanque se verificó que la temperatura de la leche estuviera inferior a 6 °C y teniendo en cuenta que el agitador o las aspas del tanque estuvieran prendidas al menos durante 5 minutos antes de la toma de la muestra. Posteriormente, se rotularon los dos frascos estériles con el código que fue asignado a cada predio. Uno de los frascos contenía un conservante “bronopol”, empleado para el análisis de células somáticas y enviados por el laboratorio de diagnóstico. Para la toma de la muestra se utilizaron guantes desechables de nitrilo y el colector utilizado para sacar la muestra era de acero inoxidable y fue lavado y desinfectado previamente con alcohol aplicado con un spray y flameado durante 30 segundos haciendo movimientos circulares y asegurándose que el fuego se extendiera por todas las superficies. Posteriormente se retiró la tapa del tanque tomando siempre en primer lugar la muestra en el frasco estéril y posteriormente la muestra con el frasco que contenía el conservante bronopol. Estas muestras se enviaron refrigeradas (4 - 7 °C) al laboratorio de calidad de leche de la Universidad de Caldas en transporte especializado y el tiempo transcurrido en iniciar el proceso de colecta hasta el análisis no superó las 24 horas.

2.3 Procedimiento para la realización del cultivo

Los análisis bacteriológicos de las muestras de leche se realizaron siguiendo los protocolos y la metodología descrita por el National Mastitis Council (1999), y la Red Canadiense para la Investigación en Mastitis (Hogan *et al.*, 1999).

Para la identificación de las bacterias se utilizaron los medios: A) Agar sangre; para identificación de bacterias Gram-positivas y la presencia de sangre permite la determinación de la hemólisis. B) Agar sangre con esculina; esta esculina permite diferenciar especies de estreptococos. C) Edward modificado con colistín; medio indicado para identificación de *Streptococcus agalactiae* y D) MacConkey; empleado en el reconocimiento de enterobacterias no fermentadoras de lactosa.

De acuerdo a la metodología propuesta por Hogan *et al.* (1999), la alícuota de un ml de leche se divide en cuatro partes y cada una de estas se cultiva en un agar diferente.

La identificación de las bacterias se realizó según los siguientes criterios:

Posterior a la incubación a 37°C, examinando a las 24 y 48 horas, se realizó la coloración de Gram para determinar morfología y tinción clasificándolas inicialmente como cocos o bacilos Gram-positivos y Gram-negativos. Posteriormente se clasifican así:

Las bacterias del género Streptococo fueron confirmadas mediante coloración de Gram y negatividad a la prueba de catalasa. Pruebas complementarias que se realizaron fueron las pruebas de CAMP, reacción hidrólisis esculina y crecimiento bacteriano en medio enterococcosel.

- La coloración Gram-positiva y la reacción para bacilos catalasa positivos fueron indicativos de *Corynebacterium* sp. o *Bacillus* sp.
- Las bacterias *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. fueron identificadas mediante la coloración Gram-negativa, reacción negativa a la oxidasa y su apariencia típica en agar MacConkey. Para la identificación del género se realizaron las pruebas de citrato, indol, motilidad.
- Otros bacilos o cocos Gram-negativos y positivos a la prueba de oxidasa fueron considerados como otras bacterias Gram-negativas.
- En cuanto a los patógenos infecciosos, el *Staphylococcus aureus* se identificó mediante coloración de Gram y la doble zona de hemólisis en el agar. Los

Staphylococcus coagulasa negativos (SCN) fueron identificados mediante la coloración de Gram y la ausencia de hemólisis en el agar. El *S. aureus* se confirmó por una reacción positiva a ambas pruebas, mientras que los SCN son confirmados cuando hay negatividad a ambas pruebas.

- Las colonias sospechosas de *Streptococcus agalactiae* se identificaron basándose en su morfología y en la hemólisis, luego fueron sub-cultivadas en agar sangre con esculina confirmando el diagnóstico cuando se presentó el crecimiento en este agar. La confirmación final de las colonias sospechosas se hizo mediante reacción Christie, Atkins, Munch-Petersen (CAMP).

Los métodos mencionados fueron suficientes para la identificación de las principales bacterias de tipo ambiental e infeccioso que se pueden encontrar en tanque de almacenamiento de leche fría.

2.4 Procedimiento para análisis de células somáticas

Para el análisis de células somáticas fue enviada una muestra en tubo con conservante bronopol (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol) al laboratorio de la Universidad de Caldas y de allí fue enviada a laboratorio de la Universidad de Antioquia para ser analizadas con equipo Fossomatic con certificación ISO 13366 - 1:2008 (IDF 148-1: 2008) para células somáticas. Este tiene un método directo que actualmente se utiliza para el recuento celular; el equipo efectúa el RCS mediante tecnología conocida como fluoro-optoelectrónica, donde el ADN, componente primordial de las células somáticas se tiñe con solución colorante emitiendo fluorescencia de color rojo, la que es detectada por el equipo para realizar el conteo de cada una de éstas. Además de la confiabilidad de éste equipo, tiene la ventaja de analizar un gran número de muestras por hora.

2.5 Análisis estadístico

Para evaluar el efecto de las variables en estudio (producción de leche, finca, precipitación, tipo de descarga, número de vacas en ordeño, BPG, zona, tipo de ordeño, raza, suministro de pollinaza y total de bacterias por muestra) sobre la presencia de microorganismos infecciosos (*S. aureus* y *S. agalactiae*) y el recuento de células somáticas, se realizó una categorización de las variables de respuesta para su posterior análisis. La variable microorganismos infecciosos se convirtió en una variable binaria,

cuyas opciones de respuesta eran presencia o ausencia de *S. aureus* y *S. agalactiae*. En el caso del RCS, en una primera instancia se analizó como una variable continua, sin embargo, se encontraron variaciones muy altas ($CV > 80\%$), por lo que se consideró mejor transformarla a una clasificación lineal según NMC (2006) y analizarla bajo esta escala. De esta manera la variable RCS quedó representada como una variable categórica ordinal.

2.5.1 Conglomerados

Se realizó un análisis de conglomerados por la variable finca, teniendo en cuenta como variable de respuesta la producción de leche, para generar grupos homogéneos de fincas en cuanto a su productividad, y al mismo tiempo incrementar el número de observaciones en los grupos generados y de esta manera aumentar la eficiencia del análisis. Se utilizó el proc cluster del paquete SAS 9.1, y el método de agrupamiento fue el de encadenamiento promedio (average linkage) y la distancia euclídeana. El número de clusters se determinó teniendo en cuenta los criterios de cubic clustering criterion (CCC), pseudo F (PSF) y t2 (PST2), los cuales, finalmente indicaron la necesidad de generar 4 agrupaciones.

2.5.2 Análisis de las variables microorganismos infecciosos (*S. aureus* y *S. agalactiae*) y RCS

Para el análisis de las variables categorizadas se realizaron regresiones logísticas múltiples usando el proc logistic del paquete estadístico SAS 9.1.

Las regresiones logísticas permiten describir la relación entre una serie de variables predictoras (continuas y categóricas) y una variable de respuesta categórica, la cual puede tener dos (binaria) o más respuestas con o sin un orden específico (ordinales o nominales). De esta manera, la regresión logística permite modelar la probabilidad de que un evento específico suceda. Para hacerlo, es necesario transformar las variables de respuesta categórica en términos de log odds. Un odds no es más que la relación entre la probabilidad de que suceda un evento específico y la no probabilidad de ese mismo evento. Al valor de odds se le estima su logaritmo natural (log odds), y es con este parámetro que se puede evaluar el efecto de las variables predictoras, ya que el log odds presenta una relación lineal con las mismas (Flom, 2010). La función de enlace (link

function) que permite hacer la transformación de probabilidad a log odds se denomina logit y se pueden representar de la siguiente forma:

$$\text{logit}(\pi) = \log(\pi/(1-\pi)) = \alpha + \beta_1 * \mathbf{x}_1 + \dots + \beta_k * \mathbf{x}_k = \alpha + \mathbf{x} \boldsymbol{\beta}$$

La función de enlace inversa que transforma el valor logit de nuevo a valores de proporción o “probabilidad” es la función logística:

$$P_i = e^{(\alpha + \mathbf{x} \boldsymbol{\beta})} / (1 + e^{(\alpha + \mathbf{x} \boldsymbol{\beta})})$$

Cuando se realiza una regresión logística, los coeficientes de regresión (β_i) estimados están en términos de log odds, y estiman el incremento o disminución en este parámetro por unidad de cambio de la variable independiente. No obstante, los resultados de estas regresiones se expresan usualmente en términos de odds ratio (OR). Este parámetro surge al potenciar e (euler) al valor de los coeficientes log odds, y su interpretación es similar a la mencionada anteriormente, sin embargo, en esta ocasión mide los cambios en términos de odds. Valores de OR = 1 indican que no hay cambios en la probabilidad modelada, OR > 1 indica que hay incrementos en la probabilidad modelada, y OR < 1 indica que hay disminuciones en la probabilidad modelada. El OR viene acompañado de los límites de confianza de Wald (95%) los cuales son útiles para estimar la precisión de los OR (Szumilas, 2010).

Con esta información, en el presente estudio se ajustó un modelo de regresión logística binomial para la variable microorganismos infecciosos, en donde se modeló la probabilidad de “no” presencia de microorganismos infecciosos. Por su parte, con la variable RCS se ajustó una regresión logística ordinal a través de un modelo de probabilidades proporcionales (proportional odds model) y en este caso se modeló la probabilidad de tener recuentos bajos. En ambos casos, se utilizó el criterio de eliminación de variables “backward” ($P < 0.05$), donde se van eliminando las variables que no son significativas así quedarían solo aquellas variables que presentaran relación con los microorganismos infecciosos. En el caso de la variable binaria microorganismos infecciosos, fue evaluado mediante la prueba de Hosmer y Lemeshow (Dohoo *et al.*, 2009, Elmoslemany *et al.*, 2009), basado en un test de bondad de ajuste al modelo propuesto para comprobar si éste podría explicar lo que se observa, según la distancia entre lo observado y lo esperado entre las variables.

El modelo propuesto fue:

$$N_i = \log(\pi/(1-\pi)) = M + \beta_1 X_{1i} + \beta_2 X_{2i} + \beta_3 X_{3i} + \beta_4 X_{4i} + \beta_5 X_{5i} + \beta_6 X_{6i} + \beta_7 X_{7i} + \beta_8 X_{8i} + \beta_9 X_{9i} + \beta_{10} X_{10i} + \beta_{11} X_{11i} + \varepsilon_i$$

Donde:

N_i = i-esima probabilidad modelada. Binomial (no presencia de microorganismos infecciosos), ordinal (bajos RCS).

M = pendiente

X_1 = Efecto de la variable Producción de leche

X_2 = Efecto de la variable Hatos (cluster)

X_3 = Efecto de la variable tipo de descarga de leche a tanque

X_4 = Efecto de la variable capacidad del tanque

X_5 = Efecto de la variable número de vacas en ordeño

X_6 = Efecto de la variable BPG

X_7 = Efecto de la variable zona

X_8 = Efecto de la variable tipo de ordeño

X_9 = Efecto de la variable raza

X_{10} = Efecto de la variable suministro de pollinaza a las vacas en el ordeño

X_{11} = Efecto de la variable total de bacterias por muestra

ε_i = Error acumulado

β_i = Coeficientes de regresión asociados a cada variable independiente

Con las variables independientes que mostraron ser significativas, con relación a los microorganismos infecciosos y la clasificación lineal del RCS, se realizaron tablas de frecuencia (en caso de que la variable fuera categórica) y medidas descriptivas (en caso de que la variable fuera continua), usando el paquete estadístico mencionado anteriormente.

3.Resultados y Discusión

3.1 Población bacteriana

En la tabla 3-1 se muestran 14 bacterias identificadas y ordenadas de mayor a menor frecuencia en los 120 análisis realizados. De acuerdo a la clasificación realizada por Valero-Leal *et al.* (2010), donde diferencia las bacterias entre ambientales y las de tipo infeccioso, en este análisis prevalecieron los microorganismos de tipo ambiental con un 86% frente a un 14% de aislamientos de agentes de origen infeccioso que estuvieron representados solo por las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*.

Tabla 3-1: Población bacteriana identificada en los 120 análisis realizados y su frecuencia de identificación

Bacterias identificadas	Frecuencia de aislamientos	Cantidad de aislamientos
Bacilos Gram-negativos	96,7%	116
<i>Streptococcus</i> spp.	76,7%	92
<i>Staphylococcus coagulasa</i> <i>negativos</i>	62,5%	75
<i>Citrobacter</i> spp.	50,8%	61
<i>Staphylococcus aureus</i>	38,3%	46
<i>Enterobacter</i> spp.	26,7%	32
<i>Streptococcus uberis</i>	23,3%	28
Bacilos Gram-positivos	16,7%	20
<i>Streptococcus agalactiae</i>	15,0%	18

<i>Proteus</i> spp.	14,2%	17
<i>Pseudomonas</i> spp.	14,2%	17
<i>Klebsiella</i> spp.	5,0%	6
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2,5%	3
<i>E. coli</i>	1,7%	2

La alta prevalencia de bacterias ambientales que fueron identificados deja en evidencia las falencias que se tienen en los hatos objetivo del estudio en la higiene durante la rutina de ordeño, siendo altamente probable que esos microorganismos sean de contaminación externa y no de la glándula mamaria según como lo reporta Azevedo *et al.* (2015). La población bacteriana identificada fueron en gran proporción Gram-negativos asociados a la disminución de la calidad de la leche (Jayarao & Wang, 1999).

Al evaluar los resultados de los microorganismos de tipo infeccioso como *S. aureus* y *S. agalactiae*; estos tienen una frecuencia de 38,3 y 15% respectivamente, considerados como valores altos si se tiene en cuenta que éstos microorganismos pueden tener su origen en glándula mamaria y en éste caso, llegar a causar elevados recuentos de células somáticas, como lo confirma Azevedo *et al.* (2015), donde mencionan que son los principales microorganismos de tipo infeccioso que viven en glándula mamaria y que por su capacidad patogénica estimulan la migración de las células de defensa hacia la glándula mamaria. En estudio realizado en República Checa por Rysanek *et al.* (2007), concluyó que no todas las contaminaciones en leche de tanque con microorganismos causantes de mastitis provienen de glándula mamaria, ni tampoco todas, causan un nivel elevado del RCS, sin embargo, entre las muestras que presentaron diferencia significativa en el RCS estaba presente el *S. aureus* y *E. coli*. Finalmente, concluye que el alto porcentaje de contaminación en las muestras de tanque coincidente con bajos RCS en tanque, es debido a que no estuvieron presentes en la glándula mamaria, indicando una fuerte contaminación ambiental. Así mismo, cuando se tienen altos recuentos de células somáticas y coinciden con la presencia de microorganismos de tipo infeccioso, se puede asumir que provienen de glándula mamaria y no de contaminación. Por su parte, Jayarao *et al.* (2004), menciona que la presencia de coliformes en la leche

de tanque sugiere una contaminación fecal que puede aparecer por aguas contaminadas empleadas en el lavado del equipo y entre estas bacterias se incluyen *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., y *Citrobacter* spp.

En estudio realizado en República Checa en muestras de tanque, Ryšánek *et al.* (2009), encontró una mayor prevalencia de las bacterias de tipo ambiental (49,1%) y los microorganismos infecciosos estuvieron presentes en 28,3%, además de un 22,6% de las muestras que no presentaron crecimiento de bacterias por lo que se reportaron como negativas. Llama la atención cómo a pesar de tener condiciones diferentes de manejo y con sistemas productivos estabulados que tienen un reto de contaminación ambiental mayor al del Valle, se obtuvieron resultados más bajos en los microorganismos ambientales. Esto demuestra que en el Valle del Cauca hay un largo camino por recorrer en el análisis de las leches de tanque y en la implementación de programas enfocados a controlar la presencia de éstas bacterias. En el caso de infecciosos se reportó una mayor incidencia en República Checa siendo superior en un 14,3% comparado con el Valle del Cauca. En otro estudio realizado por Howard (2006), en Nueva Zelanda, se analizó solo la presencia de SCN y *E. coli* mostrando el 51 y 11% respectivamente, siendo mayor la presencia de SCN en el Valle de Cauca, pero cuando se tiene en cuenta solo *E. coli* el resultado fue mucho más bajo en el Valle (como era de esperarse) posiblemente por no tener los animales concentrados en pequeñas áreas donde tiene contacto permanente con materia orgánica. Estos resultados dejan en evidencia que tiene más impacto sobre la presencia de agentes ambientales las condiciones de manejo, la limpieza, calidad de aguas y la higiene de los equipos que el tipo de sistema productivo que se tenga.

Azevedo *et al.* (2015), también realizó un estudio similar en la Isla de San Miguel en Portugal donde solo se quiso medir el grado de contaminación por *Staphylococcus aureus*, SCN y *E. coli*. Los resultados mostraron que los SCN estuvieron presentes en el 100% de las muestras, *E. coli* en 75%, *Staphylococcus aureus* en 59% y otras bacterias coliformes estuvieron presentes en 35% de los casos. Es posible que las altas prevalencias de *E. coli* en estos resultados estén relacionados con el tipo de manejo que se tiene en esos hatos, teniendo en cuenta que son sistemas productivos estabulados, a diferencia del Valle del Cauca donde las vacas se encuentran en pastoreo. Sin embargo, Smith & Hogan (2008), creen que las vacas en pastoreo pueden estar en menor riesgo de mastitis ambiental en comparación con las vacas en confinamiento, porque existen condiciones en los pastos que pueden conducir a altos niveles de exposición a bacterias

ambientales como las áreas bajo los árboles donde se agrupan la mayoría de las vacas, adicionalmente en los períodos de fuertes lluvias también se tiene una alta exposición a estos microorganismos ambientales. Estas comparaciones permiten evidenciar que en el Valle del Cauca la prevalencia de *E. coli* es baja, posiblemente debido a las diferencias de manejo por el sistema productivo. Los SCN también presentaron prevalencia más baja en éste estudio, siendo de poca preocupación porque es de fácil control y su presencia no tiene gran impacto sobre el RCS aunque su prevalencia puede estar entre 0 y 100% (Schukken *et al.*, 2009). Por otro lado, Katholm *et al.* (2012), menciona que la vigilancia de las principales bacterias en tanques de leche ha sido descrita en muy pocos estudios. Sin embargo, Ryšánek *et al.* (2009), en 268 hatos en Republica Checa, encontró en tanques de frío una prevalencia de 19% para *enterococcus* spp., 14% para *streptococcus uberis*, 13% para *streptococcus dysgalactiae*, 12% para *staphylococcus aureus*, 7% para *E. coli* y 3% para *streptococcus agalactiae*. Estas prevalencias correspondieron a 15% para microorganismos de tipo infeccioso y 85% de tipo ambiental, siendo muy similar al encontrado en el Valle del Cauca, lo que permite afirmar que en tanques de frío se encontrará por lo general, una mayor prevalencia de esta población microbiana que no son de la glándula mamaria pero que en algún momento la leche es susceptible de contaminación por estos.

De acuerdo a estos resultados, Howard (2006), manifiesta que la higiene y la salud de la vaca son dos aspectos importantes que influyen la contaminación microbiana de la leche cruda. Otro aspecto importante es la temperatura y el tiempo de almacenamiento (el cual permite multiplicación bacteriana) y los tipos de bacterias presentes en los tanques de leche cruda. Sin embargo, es frecuente que una sola fuente o la combinación de varias provoquen un aumento en las bacterias en la leche de tanque.

En cuanto al *Staphylococcus aureus*, bacteria identificada en este estudio y clasificada como infecciosa, se han encontrado reportes que van desde 5,7 hasta el 29% (Katholm *et al.*, 2012), pero en Europa y Norte América, se encontró una prevalencia entre el 31 y 100% (Azevedo *et al.*, 2015). Para el Valle del Cauca la prevalencia fue de 8,63% considerado bajo, al compararlo con los resultados de Europa y Norte América. Riekerink *et al.* (2006), realizaron un estudio en Canadá donde el objetivo fue identificar los patógenos de tipo infeccioso argumentando que son los de más importancia porque pueden vivir en glándula mamaria. Los resultados de este estudio fueron un 74% de *S. aureus* y 1,6% para *S. agalactiae*.

La importancia del *S. aureus* cuando tiene su origen en glándula mamaria, radica en dos aspectos; primero, es alto recuento de células somáticas que puede ocasionar y segundo el aspecto que es relevante en este patógeno son las bajas tasas de curación de las infecciones ocasionadas por éste. Por la importancia que este patógeno tiene, Azevedo *et al.* (2015), concluyó que las 3 prácticas que incrementan la presencia del *S. aureus* en tanque son la falta de higiene durante el ordeño, ordeño de vacas con mastitis en cualquier orden y la falta de agua caliente para la limpieza y desinfección de la máquina de ordeño, prácticas que fueron encontradas con frecuencia durante la toma de muestras en el Valle del Cauca.

Jayarao *et al.* (2004), identificaron el *S. aureus* como el patógeno con mayor prevalencia en casos de mastitis clínica y notaron una asociación altamente significativa entre la frecuencia de casos positivos de *S. aureus* y *S. agalactiae* en muestras de leche del tanque con los altos RCS.

En estudio realizado por Jayarao *et al.* (2004), con la universidad del Estado de Pensilvania identificando bacterias en leche de tanque y estableciendo la cantidad de unidades formadoras de colonias por cada bacteria, encontraron que el 50% de las muestras de tanque tenían SCN, de *Streptococcus* ambientales se tenía 90%, de coliformes se presentaron en cerca del 50%, otras bacterias Gram-negativas no coliformes se identificaron en un 50%, el *S. aureus* fue detectado en el 31% de los tanques, el *Streptococcus agalactiae* se identificó en 10% de los tanques y *mycoplasma* se identificó en 7,5% de los tanques.

Por otro lado, para analizar las variables independientes y relacionar con las variables dependientes, se evidenció dispersión de los datos que se tenían de los hatos, por lo que se escogió la variable producción de leche para agrupar los hatos a través de un cluster, conformando 4 grupos homogéneos. Los datos de los cluster se relacionaron con la presencia de agentes infecciosos y el RCS sin presentar ninguna relación. El mismo método de agrupamiento fue escogido por Carrasco *et al.* (2014), quien evaluó las causas de infecciones intramamarias en Venezuela.

3.1.1 Análisis de las variables independientes frente a la presencia de microorganismos infecciosos (*S. aureus* y *S. agalactiae*)

Previamente se realizaron análisis para descartar las variables que no presentaron relación con los microorganismos infecciosos quedando como variables predictoras (producto del backward) solo el tipo de descarga y total de bacterias con una asociación significativa ($p < 0,05$) como se muestra en la tabla 3-2 en la columna “Pr > ChiSq”.

Tabla 3-2. Análisis de efectos de las variables significativas frente a los microorganismos de tipo infeccioso

Efecto	DF	Pr > ChiSq
Tipo de Descarga	1	0.0374
Total de bacterias	1	0.0240

En la tabla 3-3 se muestra que los sistemas con descarga 1 (directamente a tanque) y total de bacterias por muestra, presentaron un odds ratio de 0.444 y 0.616 respectivamente. Es decir, como el estimador del punto no supera el valor de 1 en el primer caso, demuestra que la descarga 1 (directamente a tanque) tiene menor probabilidad de presentar microorganismos infecciosos con respecto a los sistemas con descarga 2 (primero a cantina y luego a tanque), en el segundo caso, cuando se tiene mayor cantidad de bacterias por muestra se tiene mayor probabilidad de tener microorganismos de tipo infeccioso, lo que es lógico suponer al estar completamente expuesto a contaminación ambiental como lo ratifica Barbano *et al.* (2006) quienes afirman que los equipos de ordeño cerrados (con líneas de conducción directo a tanque) deben tener una menor contaminación que los equipos de ordeño mecánico con descarga a cantina porque no tienen contacto con el operario ni con el aire que en ambientes poluidos pueden ser altamente contaminantes.

Tabla 3-3. Estimadores de Coeficientes de disparidad

Efecto	Estimador del punto	95% wald Límites de confianza	
Tipo descarga 1 Vs 2	0.444	0.207	0.954
Total de bacterias	0.616	0.405	0.938

En otro estudio realizado en Antioquia por Posada *et al.* (2010), concluyen que el punto crítico no fue la cantina ni el balde, sino el tiempo transcurrido entre el ordeño y el enfriamiento de la leche por el crecimiento bacteriano, en el cual la leche permanece a la temperatura óptima para el crecimiento de bacterias, además, ni el pezón ni el balde ni la cantina ni el tanque como utensilios fueron en éste caso, el punto crítico de control, diferente a lo encontrado en el Valle donde se asume que la mayor contaminación proviene de estos elementos empleados en la rutina de ordeño.

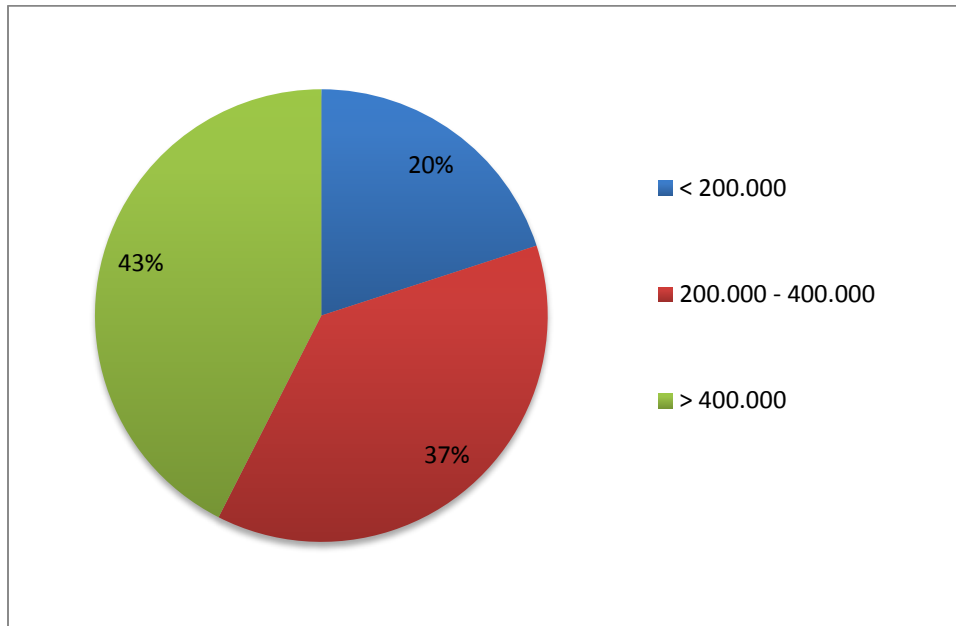
3.2 Recuento de Células Somáticas (RCS)

Para el análisis del RCS se tuvieron en cuenta los métodos de agrupación realizados por el Jayarao *et al.* (2004), y por el National Mastitis Council (2001 y 2006), quienes realizaron agrupamientos del resultado de células somáticas para diferenciar los hatos que estaban sanos, de los que estaban presentando altos recuentos celulares posiblemente causados por la presencia de algunas vacas con infección.

Descripción del resultado presentado en cada método:

1. Este primer método propuesto por Jayarao *et al.* (2004), agrupó los resultados en 3 categorías teniendo un primer rango considerado bajo < a 200.000 células/ml, rango medio de 200.000 a 400.000 células/ml y un rango alto > a 400.000 células/ml. En el gráfico 3-1 se muestra el resultado de este estudio según la clasificación de las células somáticas mencionada.

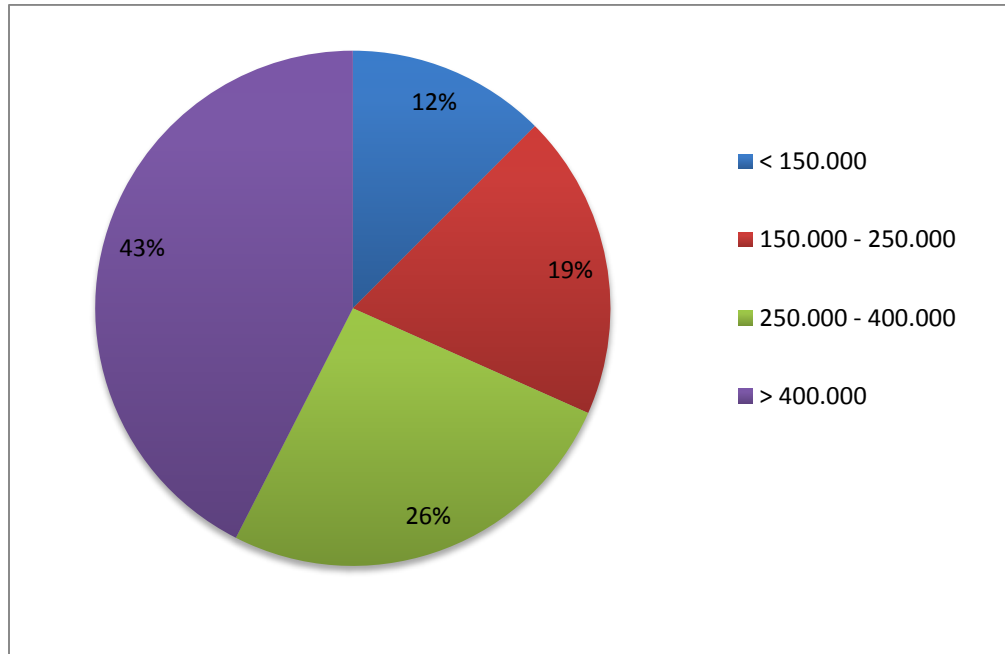
Grafico 3-1. Resultados del recuento del células somáticas, según clasificación propuesta por Jayarao *et al.* (2004).



De acuerdo al gráfico 3-1, el 43% de las muestras de tanques que se analizaron mostraron recuentos considerados altos posiblemente debido a la presencia de vacas infectadas que estaban aportando leche a estos tanques y otro 37% de los tanques que se muestrearon estuvieron en un rango que requieren especial atención porque pueden estar teniendo inicios de enfermedad en glándula mamaria o pueden estar afectados por condiciones fisiológicas como edad de las vacas ó tiempo de lactancia. El 20% de las muestras provenían de hatos que tienen vacas sanas y posiblemente con buenas práctica de manejo, de acuerdo a la interpretación reportada por Riekerink *et al.* (2007).

2. Otra clasificación fue propuesta por el NMC (2001) y se compone de 5 grupos como se ilustra en el gráfico N° 3-2.

Grafico 3-2. Resultados del recuento del células somáticas, según clasificación del NMC 2001.



De acuerdo a esto, en 120 muestras se obtuvieron 15 muestras (12%) con un RCS menor a 150.000 células/ml considerados como hatos sanos con un parámetro ideal, 23 muestras (19%) con recuentos entre 150.000 y 250.000 células/ml con un buen parámetro, pero sugiere un análisis individual porque tienen posibilidades de tener algunas vacas con altos recuentos y su objetivo debe ser disminuir estos recuentos celulares, 31 muestras (26%) que requieren empezar con un programa de mejoramiento de la calidad de la leche con recuento entre 250.000 y 400.000 y 51 muestras (43%) con recuentos superiores a 400.000 evidenciando un problema en glándula mamaria por la presencia de algún patógeno de acuerdo a lo reportado por el NMC (2001). El promedio de los 120 análisis es de 466.860 células/ml en los 4 muestreos, superior al reportado por Calderón *et al.* (2012), donde se analizaron muestras de tanque y su promedio fue de 345.133 células/ml en la zona de Montería en vacas doble propósito, lo que puede indicar que en vacas doble propósito posiblemente, por su manejo con el ternero y el escurrido a fondo de la glándula mamaria, la incidencia de infecciones es menor. En otro estudio, Vélez (2016), mostró los resultados de investigación realizadas en 15 departamentos considerados zonas lecheras (donde no se incluye el Valle del Cauca) para la planta que tiene mayor acopio de leche en Colombia. El promedio del RCS más alto fue de 571.833 células/ml para el departamento del Atlántico y el promedio más bajo fue de 202.167

células/ml en el departamento de Nariño (en estos resultados solo se incluyeron en el estudio los hatos que le entregan leche a dicha planta). De acuerdo a esto se puede concluir que el Valle del Cauca tiene valores similares a otras regiones de Colombia, por lo que se asume que deben tener condiciones de manejo y sanitarias similares, pero al presentar valores superiores al estándar internacional se deben implementar programas encaminados al mejoramiento de estos recuentos celulares.

3. En el tercer método de agrupación, según NMC (2006), se realiza un agrupamiento compuesto de 10 categorías, asignando un valor a cada categoría como se muestra en la tabla 3-4.

Tabla 3-4. Frecuencia de la CL de células somáticas de acuerdo a clasificación propuesta por NMC 2006.

Rango RCS x 1000	Clasificación lineal del RCS	Cantidad de muestras en cada rango	Frecuencia de muestras en cada rango
0 - 17	0	0	0%
18 - 34	1	2	2%
35 - 70	2	3	3%
71 -140	3	10	8%
141 -282	4	31	26%
283 - 565	5	43	36%
566 - 1.130	6	23	19%
1.131 - 2.262	7	7	6%
2.263 - 4.525	8	1	1%
> 4.526	9	0	0%

Esta forma de agrupamiento, al igual que los métodos propuestos por Jayarao *et al.* (2004), y el National Mastitis Council (2001), permite mostrar que un alto número de muestras de tanque están presentando elevados recuentos celulares, superando los estándares Europeos. Como se observa en la tabla 3-4, no se presentaron reportes del RCS menores a 17.000 (CL 0), en la CL 1 se tiene un 2% de las muestras, para la CL 2 también se encontró un 2%, para la CL 3 se presentó en un 8% de las muestras, para la CL 4 se tiene un 26% de las muestras. Para la CL 5 se encontró el 36% de las muestras, siendo el de mayor proporción en relación a las otras clasificaciones. Para la CL 6 se tuvo el 19% de las muestras. Para las CL 7 y 8 se encontró un 6 y 1% respectivamente, manifestando un estado avanzado de los procesos infecciosos en ubre de las vacas que le aportaron leche a estos tanques según lo reportado en la literatura. Para la CL 9 equivalente a conteos superiores a 4.526.000 células/ml no se presentaron reportes.

Para Colombia, hasta este momento no existe una legislación que estandarice el parámetro de células somáticas permitido para el acopio de leche cruda y que obligue a los productores a tener buenos parámetros de calidad higiénica de la leche a excepción de un solo industrial que por iniciativa propia tiene como punto de corte 800.000 células/ml para el acopio de leche, al contrario en la Unión Europea el parámetro máximo permitido es de 400.000 células/ml al igual que en Nueva Zelanda, Australia y Suiza. Para Estados Unidos el parámetro máximo permitido por el NMC es de 750.000 células/ml (Cerón *et al.*, 2007). Para Venezuela el umbral es de 500.000 células/ml y para Brasil se han presentado varios ajustes a través del tiempo de acuerdo a las exigencias de los mercados internacionales y la necesidad de disminuir las pérdidas económicas a causa de la mastitis. El primer parámetro exigido fue de 1.000.000 células/ml en el año 2005, posteriormente se proyectó para el año 2008 y el parámetro sería disminuido a 750.000 (Nero *et al.*, 2005) y a partir de julio de 2011, el parámetro fue modificado por zonas (para norte y noreste de Brasil) disminuyendo gradualmente hasta llegar a 400.000 células/ml para el 1 de julio del año 2017 según la normativa N° 62.

Además de establecer un parámetro para clasificar como leche con calidad higiénica, también se debe tener en cuenta el valor umbral para el RCS usado para clasificar cuartos como infectados, siendo variable entre países y en aquellos donde se aplican programas de control de mastitis. Nero *et al.* (2005), mencionan que recuentos superiores a 250.000 para vacas indican la presencia de la enfermedad y recuentos

mayores a 400.000 células/ml para muestras de tanque evidencian la presencia de algunas vacas con mastitis en el hato.

Actualmente en algunas regiones de Colombia las plantas que acopian leche como Colanta, Alquería y Alpina, tienen un esquema de bonificaciones sobre el RCS para motivar la producción de leche de óptima calidad, pero éstas medidas voluntarias según como se menciona en el Decreto 616 de 2006 y la Resolución 017 de 2012.

Si se tienen en cuenta los parámetros permitidos por la mayoría de países, en el Valle del Cauca se tiene un 43% de las muestras tomadas de tanque que informan recuentos superiores a 400.000 células/ml. Luego, al comparar el promedio del Valle del Cauca (466.849 células/ml) con el parámetro permitido en Europa, los valores de este estudio lo superan levemente, lo que demuestra que se debe ajustar un plan de monitoreo permanente que permita sacar conclusiones sobre el comportamiento del RCS. Por eso, la importancia que tienen estos análisis en tanque es porque es un indicador de seguimiento en los sistemas productivos.

Wenz *et al.* (2007), en estudio realizado en 4 zonas de producción lechera de Estados Unidos encontró que el 17,8% de 1.013 tanques de almacenamiento de leche fría tenían RCS superiores a 400.000 células/ml, el 56,2% estaba entre 200.000 y 400.000 células/ml y el 26,0% tenían recuentos inferiores a 200.000 células/ml lo que permite mostrar resultados inferiores a los reportados en el Valle del Cauca a pesar de tener como exigencia 750.000 células/ml y demuestra el efecto que tiene la implementación de programas de calidad de leche ejecutados en los hatos. En otro estudio realizado en Brasil por de Paula *et al.* (2004), en 32.590 hatos tuvo como media en el RCS 486.812 células/ml con una variación entre 242.000 y 602.000 células/ml. Estos datos fueron similares a los encontrados en el Valle del Cauca, aunque con una variación mucho mayor entre los valores mínimos y máximos, siendo el menor valor 32.000 y el mayor 2.694.000 células/ml.

Al analizar los resultados de los RCS de países como Canadá, Nueva Zelanda y Brasil, estos valores son inferiores a los reportados en éste estudio, lo que presenta un reto en el desarrollo de planes de mejoramiento de la calidad sanitaria de leche para llegar a los niveles internacionales en el RCS.

3.3 Relación entre la CL y las diferentes variables analizadas

El análisis demostró que las variables que estuvieron asociadas significativamente ($p < 0,05$) a la clasificación lineal de células somáticas fueron: Tipo de descarga, total de bacterias, tipo de ordeño y el suministro de pollinaza a las vacas durante el ordeño como se muestra en la tabla 3-5. Es de recordar que en éste análisis se modeló la probabilidad de tener bajos RCS y su discusión se realizará para cada variable a continuación.

Tabla 3-5. Variables que mostraron significancia frente al RCS.

Efecto	DF	Pr > ChiSq
Tipo de descarga de leche	1	0.0004
Total de bacterias	1	0.0049
Tipo de ordeño	1	0.0009
Pollinaza	1	0.0119

3.3.1 Relación entre la CL del RCS y los días en leche

Las células somáticas pueden tener variaciones ocasionadas por algunos microorganismos, pero también se puede llegar a presentar incrementos por condiciones fisiológicas propias de la glándula mamaria en algunas ocasiones producidas por el desgaste debido al tiempo que ha estado en lactancia. Por esto, se evaluó la relación que tienen los días en leche de cada hato objetivo del estudio sobre la clasificación lineal de células somáticas del tanque. Para esto se analizaron los resultados de ésta clasificación en dos momentos diferentes (junio y diciembre) para ser comparados con los días en leche promedio que presentaba cada hato en los dos momentos del muestreo. El análisis realizado en el modelo estadístico mostró que no existe diferencia significativa ($P > 0,05$) en los resultados de la clasificación lineal de células somáticas en los dos momentos que se analizaron los días en leche de los diferentes hatos. La variación promedio en los días en leche en los diferentes hatos, solo fue de 11,87 días en promedio durante 6 meses, siendo de 163,93 días en el mes de junio y de 175,8 en el mes de diciembre. Diferente a lo encontrado en éste análisis, Curbelo (2007), citado por Cuchillo *et al.* (2010), menciona que la leche de cuartos no infectados con mastitis

presenta aumentos en los RCS a medida que aumenta el tiempo de lactancia. Según Müller (2002) la probabilidad de infección aumenta a medida que avanza la lactancia, especialmente después de los 200 a 250 días en lactancia y en los días siguientes al parto sin que ello signifique un estado infeccioso.

Consecuentemente, la leche de vacas con infección intramamaria, tienen un número cada vez mayor de células de defensa como neutrófilos seguidos de macrófagos y linfocitos que pasan directamente a glándula mamaria mientras que el número de células epiteliales se mantiene sin cambios. La proporción de las células de defensa puede llegar a ser de 90% y las células epiteliales del 10% según Müller (2002), lo que indica que esta condición fisiológica no afecta en gran proporción el RCS y estos aumentos marcados en el RCS se deben básicamente a la presencia de un reto inflamatorio.

Más recientemente, Cicconi-Hogan *et al.* (2013), menciona que los efectos de la etapa de la lactancia, la edad y la estación sobre el RCS son muy pocos si la glándula no está infectada y terminan concluyendo que pocos factores distintos al estado de infección tienen un impacto significativo en el RCS de la leche. Por otro lado Ramírez *et al.* (2016), mencionan que esta prueba es muy importante en casos de diagnóstico de mastitis subclínica, aunque presenta gran variabilidad debido a que el número de células somáticas es fisiológicamente variable con aumento al parto y final de la lactancia y a que otros factores como edad, raza y hora de toma de la muestra, pueden afectar el RCS, pero no de manera drástica.

3.3.2 Relación entre la CL del RCS y el tipo de ordeño (manual o mecánico)

Independiente del tipo de ordeño que se utilice, éste requiere de una consistente higiene de la ubre y el sitio de ordeño. Por eso, el objetivo de un buen ordeño es asegurarse que se realiza en pezones limpios y con ubres bien estimuladas, que la leche sea extraída en forma rápida y eficiente. De acuerdo a esta premisa, se quiso identificar si el tipo de ordeño influyó sobre el RCS para este estudio. De acuerdo al análisis estadístico se demostró que para este estudio los hatos con ordeño manual presentaron un impacto significativo $P < 0,05$ sobre la clasificación lineal de células somáticas. Este resultado coincide con lo observado por Ramírez *et al.* (2009), en San Pedro de los Milagros

(Antioquia), donde se observó que de 55 muestras enviadas al laboratorio, 50 (91%) resultaron con un recuento celular mayor de 500.000 células/ml, de las cuales 35 (70%) provenían de ordeño manual y 15 (30%) provenían de ordeño mecánico. Vélez (2016), manifiesta que, en Colombia y Bolivia, los ordeños manuales están asociados con los altos recuentos de células somáticas y un incremento en el riesgo de infección. En contraste, un estudio en Brasil concluyó que se presentó más alto recuento celular en ordeños mecánicos (Ruiz *et al.*, 2011). Similar resultado encontró Martínez (2006), en estudio realizado en la sabana de Bogotá, donde halló que los ordeños mecánicos objetivo del estudio presentaron los recuentos más altos con un 61,2% de infección en vacas. Farias *et al.* (2005) manifiesta que es indudable que en el caso de los animales ordeñados en forma mecánica la elevada respuesta inflamatoria puede estar ocasionada por la aplicación de un ordeño inapropiado o por el mal funcionamiento de la máquina.

3.3.3 Relación entre la CL del RCS y la precipitación

Existe tendencia al aumento de las células somáticas en las épocas de alta pluviosidad, posiblemente porque las condiciones de higiene cambian y se hace más difícil mantener el ambiente limpio, aumentando la contaminación bacteriana. Elbably *et al.* (2013) afirma que el clima y/o la época del año influyen directamente sobre la presencia de mastitis y durante la época lluviosa es cuando existe una mayor proliferación y transmisión de microorganismos, y por ende una mayor contaminación, prevalencia de mastitis y alteración en la calidad de la leche.

De acuerdo a lo anterior, se quiso determinar si la CL del RCS fue afectado por la condición climática (precipitación). Para ello se comparó el comportamiento de los recuentos de las células somáticas en los diferentes períodos con las precipitaciones reportadas por 5 estaciones meteorológicas de Cenicaña distribuidas en las diferentes zonas donde estaban los hatos que hicieron parte del experimento. Este análisis fue realizado teniendo en cuenta las fechas de los muestreos como se muestra en la tabla 3-6. El análisis concluyó que no se presentó un efecto significativo ($P > 0,05$) sobre la clasificación lineal a pesar de presentarse 6 veces más la precipitación en el mes de octubre comparado con el mes de diciembre.

Tabla 3-6. Promedios de precipitación en 4 momentos en las zonas de muestreo comparado con la clasificación lineal del RCS.

	Precipitación (mm)	Media de la CL del RCS
Muestreo 1 (Junio)	52,49	5
Muestreo 2 (Agosto)	20,47	5
Muestreo 3 (Octubre)	79,77	5
Muestreo 4 (Diciembre)	13,14	5

Es de tener en cuenta que en el período de evaluación de este proyecto, se presentó una variación en el comportamiento de las precipitaciones a causa del “fenómeno del niño” donde las precipitaciones disminuyeron dramáticamente con respecto al mismo período del año 2014 y del 2013 donde las condiciones fueron “normales”. Para mostrar las diferencias se presenta la tabla 3-7 donde en promedio cayeron 92,15 mm por mes en el año 2014 y 84,03 mm en el año 2013. En esa misma temporada la precipitación fue de solo 35,8 mm en el año 2015. Este fue el mismo comportamiento que se presentó en las 35 estaciones meteorológicas que tiene Cenicaña en el Valle del Cauca.

Tabla 3-7. Comparativo de precipitación en los años 2015, 2014 y 2013 en las zonas las zonas donde fueron realizados los muestreos.

	Precipitación (mm) 2015	Precipitación (mm) 2014	Precipitación (mm) 2013
Muestreo 1 (Junio)	52,49	57,01	59,23
Muestreo 2 (Agosto)	20,47	43,73	46,32
Muestreo 3 (Octubre)	79,77	197,43	165,2
Muestreo 4 (Diciembre)	13,14	70,46	65,4

En conclusión, se puede mencionar que para éste estudio la precipitación no afectó los resultados de manera significativa posiblemente porque lo presentado en ésta temporada no fue suficiente de acuerdo a lo reportado por Martínez (2006), quien concluyó que el mayor desafío por contaminación en las rutinas de ordeño y por consiguiente la tasa de

infección en glándula mamaria se incrementa ligeramente cuando las lluvias son mayores de 100 mm al mes (lo que no sucedió en el Valle durante los meses del muestreo por causa del fenómeno del niño).

Vásquez *et al.* (2012), en un estudio realizado en varias zonas de Colombia, concluyó que los recuentos de células somáticas variaron entre 586.000 y 676.000 células/ml, siendo mayores en enero y febrero (época de verano) y más bajos en septiembre, octubre y noviembre (invierno). Entre las variaciones informadas en los diferentes meses no se presentaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de RCS. Por su parte, Martínez (2006), concluye que las altas precipitaciones son un factor de riesgo por tener mayor contaminación, pero no afectan de manera directa los resultados del RCS.

Las condiciones de verano o invierno en los países del trópico como Colombia son diferentes a las presentadas en otros países como Estados Unidos o Europa donde el invierno si afecta significativamente el RCS por los excesos de humedad presentados y altos niveles de contaminación que incrementan la presentación de la mastitis a causa de patógenos de tipo ambiental, según lo concluye Smith (2008), quien además menciona que en épocas de verano el factor que estimula los incrementos de células somáticas puede ser el estrés calórico.

En otro estudio realizado por Zucali *et al.* (2011), manifestaron que el efecto de estación de invierno, influyó las variaciones en la calidad de la leche por el mayor desafío en la contaminación de las vacas y salas de ordeño y los cambios de temperatura y humedad pueden tener fuertes efectos sobre la presencia de microorganismos en la leche. Para el estudio realizado en Italia, la estación afectó la presencia total de patógenos con una tendencia a aumentar los recuentos de células somáticas durante el invierno, debido a que las vacas estuvieron más sucias en la temporada fría en comparación con la temporada cálida.

3.3.4 Relación entre la CL del RCS y el número de vacas en ordeño

De acuerdo a lo evaluado en éste estudio, la cantidad de vacas en ordeño no afectó la CL del RCS de manera significativa a pesar de tener variaciones en los hatos que van desde 15 vacas hasta 480 vacas en ordeño.

Para entender un poco mejor como estaban distribuidos los hatos de acuerdo al número de vacas en ordeño, se muestra en el gráfico 3-3 la distribución de los hatos que se incluyeron en el muestreo. Esto deja en evidencia como en el Valle del Cauca predominan los sistemas productivos con menos de 50 vacas en ordeño (47%) y son pocos los hatos (13%) con más de 200 vacas en ordeño (Tabla 3-8). Esto coincide con lo reportado por FEDEGAN (2014), donde se menciona que solo el 2% de los hatos en el Valle tienen más de 200 vacas en ordeño. Este análisis muestra que el número de vacas no es una variable que afecte el RCS.

Grafico 3-3. Distribución según número de vacas en ordeño.

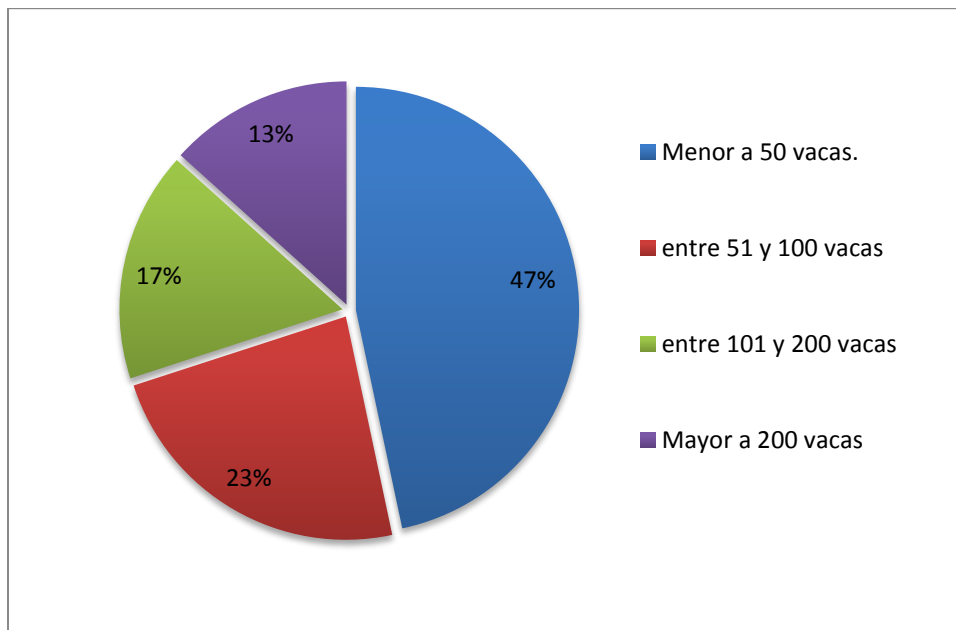


Tabla 3-8. Resultados del recuento de células somáticas de acuerdo a número de vacas en ordeño.

Vacas en ordeño	Nº de Muestras	Media de la CL del RCS	%
< 50	56	5	47
Entre 50 y 100	28	5	23,3
entre 101 y 200	20	5	16,6
> a 200	16	5	13,3

3.3.5 Relación de la CL del RCS con la producción de leche de cada hato

Para éste estudio la producción de leche no afectó la CL al no presentar diferencia significativa ($P > 0,05$) en el resultado del recuento de células somáticas en los hatos con diferentes niveles de producción.

Al igual que en la variable de cantidad de vacas en ordeño por hato, se ilustra en la tabla 3-9 como estaban distribuidos los hatos, de acuerdo a las producciones de leche. En el primer grupo se tiene una alta proporción de hatos con producciones inferiores a 500 litros por día, seguidos de los hatos que producen entre 500 y 1.000 litros por día y así disminuye el porcentaje hasta llegar a los hatos que producen más de 3.000 litros de leche por día con un 7%. Su importancia es porque las vacas con altos registros de producción de leche son más propensas a presentar altos recuentos de células somáticas (Mora *et al.*, 2015) y una de las utilidades que tiene el conocer el resultado del RCS y relacionar con la cantidad de leche que se produce en el hato es para realizar cálculos de las pérdidas económicas como consecuencia de la mastitis por la disminución en las producciones de leche. Así, según Keef (2010), por el incremento de cada 100.000 células somáticas a partir de 200.000, se pierde alrededor del 2% de la producción de leche total del hato.

Tabla 3-9. Agrupamientos de los hatos de acuerdo a la producción de leche en cada sistema productivo.

Producción de leche Lt por día	Nº de Muestras	Proporción de los hatos
< 500	52	43%
Entre 500 y 1000	28	23%
Entre 1001 y 2000	20	17%
Entre 2001 y 3000	12	10%
> a 3000	8	7%

Por su parte Ramírez *et al.* (2016), determinaron que se encontró una correlación negativa entre producción de leche y el RCS durante la lactancia, es decir que se presentaba una relación inversa, siendo probable que se presente un efecto de dilución de las células somáticas, pero este incremento va a depender directamente de la presencia de mastitis en las vacas. Contrario a esto, Elbably *et al.* (2013) concluyeron que existe una alta relación entre la producción de leche y la ocurrencia de mastitis.

3.3.6 Relación de la CL del RCS con la caracterización racial (predominio de razas *Bos taurus* o *Bos indicus*)

Colombia cuenta con cerca de 40 millones de hectáreas dedicadas a la actividad ganadera, de las cuales más de un 60% están ubicadas en altitudes menores a los 1000 metros sobre el nivel del mar y en temperaturas que oscilan entre los 23°C y los 32°C según FEDEGAN (2015). Gran parte de los hatos incluidos en el estudio se encontraban bajo estas condiciones climáticas. Ésta condición obliga a los productores a buscar alternativas de cruzamientos que le aporten rusticidad a sus animales. Las opciones para éstos cruzamientos básicamente son las razas: Brahaman, Gyr, Guzerat y Nelore. Se trata de animales con capacidad de resistir altas temperaturas y principalmente los ataques de ectoparásitos que se presentan en el Valle del Cauca. La desventaja que presentan éste tipo de animales son las conformaciones de ubre y pezones que predisponen la presentación de patologías en glándula mamaria, siendo un factor de riesgo permanente en los sistemas productivos.

En la tabla 3-10 se muestra la distribución que presentaron los hatos según su caracterización racial entre *Bos taurus* y *Bos indicus*, de acuerdo al predominio mayor al 50% de cada una de estas razas. De los hatos seleccionados para el muestreo, un 67% de los hatos tenía más del 50% de sangre *Bos taurus* y el restante 33% eran vacas de ordeño con mayor proporción de *Bos indicus*.

Esta clasificación se consideró importante hacerla para determinar si los cruces realizados en los hatos que fueron objeto de estudio incidieron sobre la presentación de altos RCS.

La caracterización racial frente a la CL del RCS no presentó diferencia significativa ($P > 0,05$) entre los dos grupos y se demuestra que esta variable no tiene relación con la CL de los hatos.

Tabla 3-10. Resultados de la CL del RCS agrupados de acuerdo a la caracterización racial.

Caracterización Racial	Nº de Muestras	Media de la CL del RCS	% de Muestras
> al 50 de <i>Bos taurus</i>	80	5	67%
> al 50 de <i>Bos indicus</i>	40	5	33%

Sin embargo, Schukken *et al.* (2010), mencionan que dentro de los factores asociados a los altos recuentos por parte de la vaca se mencionan la raza, la predisposición genética, el número de partos o lactancias, la etapa de la lactancia y el nivel de producción, básicamente relacionados con su conformación de ubre por predisponer la presentación de la mastitis. Coincidiendo con esto, Mora *et al.* (2015), menciona que una vaca puede presentar predisposición genética a contraer mastitis, asociada a determinadas características anatómicas, estado nutricional, número de partos ó estado de lactancia.

3.3.7 Relación de la CL del RCS con la ubicación de los hatos (m.s.n.m.)

Para escoger los hatos que hicieron parte del estudio, también se tuvo en cuenta la zona donde se ubican los hatos (zona alta y zona baja) de acuerdo a la altura sobre el nivel del mar y posteriormente determinar si esta variable (m.s.n.m.) en el Valle del Cauca, podría

tener relación con la CL del RCS. Esta evaluación se tuvo en cuenta por la creencia de que en trópico alto se tienen mejores resultados en los RCS porque aparentemente se tiene menor estrés calórico. En la tabla 3-11 se muestra la proporción de hatos en zona baja y zona alta, así como también el resultado de la CL. El estudio concluyó que ésta variable no presenta relación ($P>0,05$) con la CL del RCS.

Tabla 3-11. Resultados de la CL del RCS agrupados de acuerdo a la ubicación de los predios (m.s.n.m.).

UBICACIÓN	Nº de Muestras	Media de CL del RCS	% de Muestras
Zona Alta	64	5	53%
Zona Baja	55	5	46%

Lo encontrado en este estudio coincide con lo mencionado por Mora *et al.* (2015), donde no encontraron variación significativa en el RCS de acuerdo a la ubicación de los hatos, pero si mencionan que algunos de los factores del entorno que pueden influir en el resultado de las células somáticas son la zona donde se ubica la finca y las condiciones climatológicas, por lo tanto, se deben seguir teniendo en cuenta en los estudios sobre calidad higiénica y microbiológica de la leche.

3.3.8 Relación de la CL del RCS con el hecho de estar certificados o no en buenas prácticas ganaderas (BPG)

De acuerdo a lo exigido por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), los predios certificados en BPG deben cumplir con las normas y protocolos establecidos para garantizar la inocuidad del producto final (leche). Bajo esta premisa se quiso verificar si los hatos certificados en BPG efectivamente presentaban mejores resultados en el recuento de células somáticas, lo encontrado se aprecia en la Tabla 3-12.

Al analizar la CL del RCS de los hatos certificados en BPG y comparar con los valores de los hatos no certificados se demostró que no hay diferencia significativa ($P>0,05$) entre estos, indicando que para este estudio las BPG no tienen relación con la CL del RCS.

Sin embargo, cuando se analizan los valores máximos del RCS como se presenta en la tabla 3-13, se observa que estos valores corresponden a los hatos que no contaban con

certificación en BPG, lo cual evidencia el hecho conocido que las BPG contribuyen a mejorar los procesos de higiene y sanidad en el ordeño por la obligatoriedad en el cumplimiento de protocolos establecidos para todos los procedimientos, aunque se tendría que realizar nuevos estudios cuando la cantidad de hatos certificados sea mayor, para confirmar si éste mejoramiento es significativo. Según Moreno (2014) y Cerón *et al.* (2015), es lo esperado en este tipo de sistemas en los cuales la instauración de BPG conlleva a mejorar la calidad higiénica y microbiológica de la leche. Ortiz & Vera (2006), coincidieron en afirmar que las BPG llevan a los hatos a tener un mayor nivel tecnológico y al comparar esta variable con los hatos no certificados se tienen diferencias significativas cuando se evalúan las células somáticas. Un aspecto a tener en cuenta es el poco número de hatos certificados con BPG que se tiene en el muestreo, lo cual es un reflejo de lo que sucede a nivel regional donde de 10.441 predios solo están certificados en BPG 65, correspondiendo a un 0,06% de hatos certificados en el Valle del Cauca (ICA, 2016).

Tabla 3-12. Resultados de la CL del RCS y su relación con la certificación o no en Buenas Prácticas Ganaderas (BPG).

Certificados en BPG	Media de la CL del RCS	Cantidad de Muestras
SI	5	12
NO	5	108

Tabla 3-13. Relación del RCS con las BPG en 4 muestreos realizados en leche de tanque en el Valle del Cauca.

Certificación BPG	Muestreo	Variable	n	Media	D. E.	C.V.	Valor Mínimo	Valor Máximo
Si	1	RCS	3	490	281,18	57,38	184	737
Si	2	RCS	3	657,67	249,83	37,99	371	829
Si	3	RCS	3	651	327,28	50,27	423	1026
Si	4	RCS	3	512	251,5	49,12	308	793
No	1	RCS	27	334,56	233,5	69,82	30	906
No	2	RCS	27	582,22	532,92	91,53	50	2694
No	3	RCS	27	423,93	361,17	85,2	61	1377
No	4	RCS	27	477,41	450,32	94,33	59	1909

Uno de los aspectos evidenciados en los hatos que están certificados, es el propósito de obtener la certificación. Para la mayoría de los hatos su primera razón es obtener las bonificaciones por litro de leche producido y no la de mejorar sus procedimientos a través de protocolos establecidos de manera permanente. Patiño, (2012), menciona que el mayor beneficio que obtienen los hatos certificados en buenas prácticas ganaderas, es el aumento en la rentabilidad del sistema productivo por la estandarización de los procesos, controlando todos los procesos ejecutados en los hatos.

3.3.9 Relación lineal del RCS con microorganismos de tipo infeccioso (*S. aureus* y *S. agalactiae*)

Para este estudio, la prevalencia de los microorganismos de tipo infeccioso fue baja (14%), sin embargo, presentaron una directa relación con el RCS afectando significativamente ($P < 0,05$) el RCS. Similar respuesta encontró Katholm *et al.* (2012), donde concluyó que los altos recuentos de células somáticas de su estudio se atribuyeron en mayor grado a los agentes infecciosos *S. aureus* y *S. agalactiae*, y bajos niveles del RCS para *SCN*, *E. coli* y otros ambientales que no logran vivir por largo tiempo en la glándula mamaria. Sin embargo, Riekerink *et al.* (2006), manifiesta que en

algunos casos la presencia de *S. agalactiae* no está correlacionada con altos recuentos de células somáticas posiblemente por contaminación de personas que tienen contacto con los animales durante el ordeño. Mitterhuemer *et al.* (2010), coinciden al afirmar que muy pocos hatos con problemas de SCN tendrían un aumento importante en los RCS que podrían atribuirse a este tipo de infecciones. Por otro lado, Riekerink *et al.* (2007), mencionan que los altos recuentos también pueden llegar a estar influenciados por otros factores como número de partos, tiempo de lactancia, manejo y factores ambientales como temperatura, humedad y precipitación, teniendo en cuenta que esto va a depender de las condiciones específicas de cada hato. Esto deja en evidencia que son muchos los factores que pueden afectar los recuentos celulares y al momento de implementar un programa de mejoramiento, se deben trabajar todos los aspectos relacionados simultáneamente. Al igual que en este estudio, Jayarao *et al.*, (2004), Rysanek *et al.*, (2007) y (Cuchillo *et al.*, 2010) concluyeron que las tasas de aislamiento de *S. aureus* y *S. agalactiae* estuvieron asociadas significativamente con altos RCS en leche de tanque y Fenlon *et al.* (1995) mostró una correlación significativa entre la presencia de *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* y *S. uberis* en leche de tanque con el RCS.

Por su parte Schukken *et al.* (2009) y Barbano *et al.* (2006), mencionan que los altos recuentos de células somáticas en una vaca o en leche del tanque se incrementan como respuesta a un agente que por lo general es un patógeno infeccioso y su capacidad de respuesta va a depender de tipo de agente patógeno que esté presente en la vaca teniendo mayor importancia los de tipo infeccioso. De acuerdo a esto, es muy probable que los altos recuentos de células somáticas en los hatos que presentaron microorganismos infecciosos provenían de vacas que estaban infectadas.

3.3.10 Relación de la CL del RCS con la cantidad de bacterias identificadas en cada muestra

En la tabla 3-14 se muestra como a partir de 4 bacterias en tanque, a más bacterias identificadas, el resultado en la CL es más alto. Por ejemplo, en las muestras donde se identificaron 5, 6 y 7 bacterias aumentó progresivamente pasando de una CL de 4 con 4 bacterias a una CL de 6 con 7 microorganismos identificados en leche de tanque. Sin embargo, si se analiza los valores máximos de la clasificación lineal, se tiene el valor más alto cuando se tenían 4 bacterias. Esto sugiere que cada patógeno

puede hacer un aporte diferente en la presentación de las células somáticas pero conservando la tendencia de aumento en la clasificación lineal en la medida que aumenta el número de esta población bacteriana, sin embargo, ésta respuesta también va a depender del tipo de bacteria (ambiental o infeccioso) que esté presente en el tanque, siendo más fuerte la respuesta de células somáticas cuando los patógenos son de tipo infeccioso (Reyes *et al.*, 2017).

Tabla 3-14. Relación de la cantidad de bacterias identificadas con la clasificación lineal del RCS.

Cantidad de bacterias	Media de la CL	CL máx.	CL min.
7	6	6	6
6	5	7	4
5	5	7	2
4	5	8	1
3	5	6	4
2	4	5	2

A pesar del gran volumen de información surgida en los últimos años sobre las diferentes causas de contaminación de la leche de tanque a nivel mundial y su prevención, además de las causas que pueden causar el incremento en las células somáticas, se observó en ésta investigación cómo todavía algunos aspectos elementales de la rutina de ordeño como la desinfección de los pezones y secado de los mismos y la aplicación del desinfectante pre y post-ordeño, componentes importantes de la prevención de la mastitis bovina, no se ejecutan rutinariamente en el procedimiento de ordeño en los hatos muestreados.

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

De acuerdo al estudio realizado en varias zonas del Valle del Cauca donde se encuentran grupos de hatos dedicados a producción de leche se puede concluir que predominan las bacterias ambientales sobre los patógenos de tipo infeccioso al encontrar una población microbiana de 12 microorganismos de los 14 que fueron identificados en total con una prevalencia del 86%. Los resultados también demostraron que la contaminación bacteriana de la leche ocasionada por malas prácticas de ordeño y los altos recuentos de células somáticas no están controladas, siendo necesario establecer programas y protocolos de trabajo encaminados al mejoramiento de estos sistemas productivos. Al buscar si se presentaba relación entre el RCS con diferentes variables, las que afectaron significativamente este recuento fueron: El tipo de descarga a tanque de almacenamiento de leche (descarga a cantina), el total de bacterias, tipo de ordeño (manual) y el suministro de pollinaza. En cuanto a los microorganismos de tipo infeccioso (*S. aureus* y el *S. agalactiae*), las variables que se relacionaron significativamente ($P < 0,05$) fueron las variables: tipo de descarga (descarga a cantina) y total de bacterias por muestra. Las variables que no presentaron una relación significativa, fueron: número de vacas en ordeño, cantidad de litros producidos por día, certificación en buenas prácticas ganaderas, caracterización racial, ubicación de los predios (m.s.n.m.), precipitación y días en leche.

4.2 Recomendaciones

Debido a la variación en los hallazgos obtenidos en la identificación de la población bacteriana y con diferentes tendencias a lo mostrado por algunos autores en otras partes del mundo, se sugiere realizar nuevos estudios dirigidos a precisar el origen de las bacterias que estuvieron presentes en éste estudio, realizando diagnóstico de manera individual en cada hato para identificar los animales que tienen estos microorganismos, o

en su defecto, para conocer de donde provienen, y así, poder adoptar las medidas higiénicas y sanitarias más pertinentes en cada sistema productivo.

De acuerdo a los resultados de éste estudio se sugiere enfocar esfuerzos al control de microorganismos de tipo ambiental no solo en el sitio de ordeño, sino también en los sitios donde más se detecte contaminación como potreros, caminos o cestiaderos.

Para los hatos que tienen descarga de leche a cantina y luego a tanque de refrigeración de leche, es conveniente instalar las líneas de conducción directa a tanque o en su defecto mejorar las condiciones de higiene de las cantinas y los filtros de leche, así como también lograr el enfriamiento de esta leche en el menor tiempo posible.

El ordeño manual demostró tener mayor posibilidad contaminación y alto recuento de células somáticas, por lo tanto, se deben mejorar la higiene durante el ordeño, con el propósito de controlar la presencia de bacterias de tipo ambiental, igualmente para lograr tener bajos recuentos de células somáticas.

Fue demostrado que los hatos que suministraron gallinaza como fuente de alimentación a las vacas de ordeño, presentaron mayores recuentos de células somáticas, por lo tanto, se recomienda suspender esta materia prima en la nutrición de las vacas y reemplazar por otras fuentes que no pongan en riesgo la salud de las vacas. Además porque el ICA prohíbe el uso de cualquier materia prima de origen animal para suministro a bovinos.

En otro aspecto, es necesario implementar protocolos de trabajo en diferentes áreas como la rutina de ordeño, terapia de secado y lavado de los equipos de ordeño, encaminados a mejorar uno de los indicadores de calidad en la leche como el RCS y también a disminuir la incidencia de las bacterias de tipo ambiental. Igualmente realizar análisis microbiológicos periódicos de las aguas empleadas para el lavado de los equipos.

Por último, es necesario que en el Valle del Cauca se implemente un proceso de capacitación o formación con propietarios y encargados de realizar los ordeños, encaminado a controlar todos los factores de riesgo que puedan ocasionar mastitis y contaminaciones en la leche, incluyendo un estricto seguimiento a los indicadores de higiénicos y sanitarios de la calidad de leche.

A Anexo: Resumen total de las variables analizadas para cada uno de los sistemas de producción en el estudio.

Tabla A-1. Descripción de los resultados de 5 variables analizadas en el estudio.

Código del hato	Certificada en BPG	ZONA	Tipo de Ordeño	Carac. Racial	Vacas en ordeño
1	SI	Baja	Mecánico	<i>Bos taurus</i>	35
2	NO	Baja	Mecánico	<i>Bos indicus</i>	65
3	NO	Alta	Mecánico	<i>Bos taurus</i>	38
4	NO	Alta	Manual	<i>Bos taurus</i>	35
5	NO	Alta	Manual	<i>Bos taurus</i>	40
6	NO	Alta	Manual	<i>Bos taurus</i>	25
7	SI	Baja	Mecánico	<i>Bos indicus</i>	290
8	SI	Baja	Mecánico	<i>Bos taurus</i>	490
9	NO	Baja	Mecánico	<i>Bos taurus</i>	150
10	NO	Baja	Manual	<i>Bos taurus</i>	28
11	NO	Baja	Manual	<i>Bos taurus</i>	22
12	NO	Baja	Manual	<i>Bos indicus</i>	25
13	NO	Baja	Mecánico	<i>Bos taurus</i>	42
14	NO	Baja	Mecánico	<i>Bos indicus</i>	36
15	NO	Baja	Mecánico	<i>Bos indicus</i>	230
16	NO	Baja	Mecánico	<i>Bos indicus</i>	110
17	NO	Baja	Mecánico	<i>Bos indicus</i>	170
18	NO	Baja	Mecánico	<i>Bos indicus</i>	36
19	NO	Alta	Mecánico	<i>Bos indicus</i>	140
20	NO	Alta	Mecánico	<i>Bos taurus</i>	175
21	NO	Alta	Mecánico	<i>Bos taurus</i>	74
22	NO	Alta	Mecánico	<i>Bos taurus</i>	85
23	NO	Alta	Mecánico	<i>Bos taurus</i>	125
24	NO	Alta	Mecánico	<i>Bos indicus</i>	60
25	NO	Alta	Mecánico	<i>Bos taurus</i>	88
26	NO	Alta	Mecánico	<i>Bos taurus</i>	35
27	NO	Alta	Mecánico	<i>Bos taurus</i>	62
28	NO	Alta	Mecánico	<i>Bos taurus</i>	33
29	NO	Alta	Mecánico	<i>Bos taurus</i>	26
30	NO	Alta	Mecánico	<i>Bos taurus</i>	76

B Anexo: Relación de la precipitación en la zona de ubicación de cada uno de los sistemas de explotación del estudio, durante la fase experimental

Tabla B-1. Precipitación según Cenicafía (2015) en zonas aledañas a donde fueron realizados los muestreos.

2015	Cartago	Distrito. RUT Rold.	Bugalagrande	Rio-frio	Tuluá	Yotoco	Buga
Enero	44,60	62,5	73,9	55,1	105	80,9	118,5
Febrero	0,00	121,4	42,6	57,2	38	85,9	26,3
Marzo	137,30	120,2	108,1	164,4	151,5	144,1	145,4
Abril	135,40	67,9	193,8	201,3	240,6	248,3	268,2
Mayo	61,40	40,9	56,5	75,1	25,2	76	68,3
Junio	296,00	89,3	14,1	29,4	12,6	20,3	5,7
Julio	133,40	99,2	29,1	59,1	49	41	21
Agosto	46,50	29	22,6	5,6	15,5	9	15,1
Septiembre	57,20	62,8	49,1	28,9	44,9	10,7	34,6
Octubre	55,70	91,4	82,5	79,9	93,5	78,1	77,3
Noviembre	168,80	105,8	63	97,4	111,2	83,7	111,4
Diciembre	1,50	13,4	15,8	21,8	19,4	12	8,1
Promedio	94,82	75,32	62,59	72,93	75,53	74,17	74,99

Bibliografía

Andrade, R. J., Carvajal, Z. E. C., & Baez, A. E. D. 2014. Prevalencia de mastitis subclínica bovina y su etiología infecciosa en fincas lecheras del altiplano boyacense (Colombia). *Revista Científica*, 24(4).

Azevedo, C., Pacheco, D., Soares, L., Romão, R., Moitoso, M., Maldonado, J., ... & Simões, J. (2015). Prevalence of contagious and environmental mastitis-causing bacteria in bulk tank milk and its relationships with milking practices of dairy cattle herds in São Miguel Island (Azores). *Tropical Animal Health and Production*, 1-9.

Barbano, D. M., Ma, Y., & Santos, M. V. 2006. Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life 1, 2. *Journal of dairy science*, 89, E15-E19.

Barkema, H. W., Schukken, Y. H., & Zadoks, R. N. (2006). Invited review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Science*, 89(6), 1877-1895.

Benhamed, N., & Kihal, M. 2013. Phenotypic and Genotypic Characterization of *Staphylococcus aureus* Agents of Dairy Cows' Mastitis in Algeria. *Journal of Applied Sciences Research*, 9(1), 86-93.

Bernardi, F., & Macías, E. F. (2012). Análisis de datos con Stata (Vol. 45). *Revista metodológica de España*. CIS.

Blowey, R. W., & Edmondson, P. 2010. *Mastitis control in dairy herds*. Book, 2nd Edition.

Calderón, A., & Rodríguez, V. C. 2009. Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano cundiboyacense (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias (Colombian journal of animal science and veterinary medicine)*, 21(4), 582-589.

Calderón, A., Rodríguez, V., Arrieta, G., Martínez, N., & Vergara, O. 2012. Calidad fisicoquímica y microbiológica de leches crudas en empresas ganaderas del sistema doble propósito en Montería (Córdoba). *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 15(2), 399-407.

Calderón, R. A., Arrieta G. J., & Mattar, (2010). Prevalence of mastitis in dual purpose cattle farms in Montería (Colombia): etiology and antibacterial susceptibility. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 2011; P: 19 – 28.

Calvinho, L. F., & Tirante, L. (2005). Prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en Argentina en los últimos 25 años. *FAVE Sección Ciencias Veterinarias*, 4(1/2), 29-40.

Camussone, C. M., & Calvinho, L. F. 2013. Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* asociados con infecciones mamarias en bovinos: relevancia y rol como agentes inmunógenos. *Revista argentina de microbiología*, 45(2), 119-130.

Carrasco, R., M., Peris, R., C., Ciria, C. J., Riera, N., M., & Nieves, C., L. 2014. Prevalencia e incidencia de infecciones intramamarias en vacas de raza carora en sistemas de pastoreo y estabulación. *Revista Científica*, 24(001).

Cenicaña. (2015). Base de datos de estaciones de meteorología en el Valle del Cauca. Datos publicados en página web de cenicaña: Centro de Investigaciones de la Caña de Azúcar de Colombia.

Cerón, M. F., Ramírez A. J. P., Bolivar V. D. M., Bedoya, G. I. & Palacio, L. G. 2015. Buenas prácticas ganaderas: Caracterización de sistemas de producción bovina de leche en el Norte Antioqueño y su relación con calidad higiénica y sanitaria de la leche cruda. *Livestock Research for Rural Development*. Volume 27, Article #216. Disponible en: <http://www.lrrd.org/lrrd27/11/cero27216.html>.

Cerón, M. F., Agudelo, E. J., & Maldonado-Estrada, J. G. 2007. Relación entre el recuento de células somáticas individual o en tanque de leche y la prueba CMT en dos fincas lecheras del departamento de Antioquia (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 20, 472-483.

Cicconi-Hogan, K. M., Gamroth, M., Richert, R., Ruegg, P. L., Stiglbauer, K. E., & Schukken, Y. H. 2013. Associations of risk factors with somatic cell count in bulk tank milk on organic and conventional dairy farms in the United States. *Journal of dairy science*, 96(6), 3689-3702.

Coldebella, A., Machado, P. F., Demétrio, C. G. B., Ribeiro Júnior, P. J., Meyer, P. M., Corassin, C. H., & Cassoli, L. D. (2004). Contagem de células somáticas e produção de leite em vacas holandesas confinadas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 33(3), 623-634.

Consejo Nacional de la Calidad de la Leche y Prevención de la Mastitis. 2015. Evolución y Comportamiento de las células somáticas 2005-2013. Colombia.

Cooperativa de productores de leche dos pinos R.L. 2010. Reglamento de Recibo de Leche. 26 p.

Coorevits, A., De Jonghe, V., Vandroemme, J., Reekmans, R., Heyrman, J., Messens, W., & Heyndrickx, M. 2008. Comparative analysis of the diversity of aerobic spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional dairy farms. *Systematic and Applied Microbiology*, 31(2), 126-140.

Cuchillo, H. Z., Dauqui, V. E., & Campos, G. R. 2010. Factores que inciden en el recuento de células somáticas (RCS) y la calidad de leche. Impreso universitario, Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira. P 43 – 46.

Curbelo, R. J. E. (2007). Relación entre los recuentos de células somáticas, prácticas de manejo y patógenos causantes de mastitis en hatos lecheros de puerto rico (Doctoral dissertation, 1-89).

De Paula, M. C., Ribas, N. P., Monardes, H. G., Arce, J. E., & de Andrade, U. V. C. 2004. Contagem de células somáticas em amostras de leite. *R. Bras. Zootec*, 33(5), 1303-1308.

Deluyker, H. A., Van Oye, S. N., & Boucher, J. F. 2005. Factors affecting cure and somatic cell count after pirlimycin treatment of subclinical mastitis in lactating cows. *Journal of dairy science*, 88(2), 604-614.

Elbably M. A., Emeash H. H., Asmaa N. M. 2013. Risk Factors Associated with Mastitis Occurrence in Dairy Herds in Benisuef, Egypt. *World's Veterinary Journal* 3(1):5-10.

Ellis, K. A., Innocent, G.T., Mihm, M., Cripps, P., McLean, W.G., Howard, C.V., Grove-White, D., 2007. Dairy cow cleanliness and milk quality on organic and conventional farms in the UK. *J. Dairy Res.* 74, 302–310.

Elmoslemany, A. M., Keefe, G. P., Dohoo, I. R., Wichtel, J. J., Stryhn, H., & Dingwell, R. T. 2010. The association between bulk tank milk analysis for raw milk quality and on-farm management practices. *Preventive veterinary medicine*, 95(1), 32-40.

Espinoza, S. M., & Mier, J. J. 2013. Determinación de la prevalencia de mastitis mediante la prueba California mastitis test e identificación y antibiograma del agente causal en ganaderías lecheras del Cantón el Chaco, provincia del Napo.

Farias, R., J., García U, A., D'Pool, G., Valero L., K., Allara, M., & Angelosante, G. 2005. Detección de mastitis subclínica en bovinos mestizos doble propósito ordeñados en forma manual o mecánica. Comparación de tres pruebas diagnósticas. *Revista Científica*, 15(002).

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2016. Recuperado de: http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/produccion-lechera/es/#.V_o_XJPhA_U.

FEDEGAN. 2014. Federacion Colombiana de Ganaderos. Produccion Colombia. Recuperado de <http://www.fedegan.org.co/estadisticas/produccion-0>.

FEDEGAN. 2016. Federacion Colombiana de Ganaderos. Produccion Colombia. Inventario Bovino Nacional. Consumo. Bogotá D.C. Colombia. Recuperado de <http://www.fedegan.org.co/estadisticas/produccion-0>.

Fenlon, D. R., D. N. Logue, J. Gunn, and J. Wilson. 1995. A study on mastitis bacteria and herd management practices to identify their relationship to high somatic cell counts in bulk tank milk. *Br. Vet. J.* 151:17–25.

Flom, P.L. 2010. Multinomial and ordinal logistic regression using Proc Logistic. *Nesug*, pp 1-12.

Galán, L. M. J. 2008. El nacimiento del Score de Células Somáticas. *Producción animal*, 23(248), 34-36.

Gibson, H., Sinclair, L. A., Brizuela, C. M., Worton, H. L., Protheroe, R. G., 2008. Effectiveness of selected premilking teat-cleaning regimes in reducing teat microbial load on commercial dairy farms. *Lett. Appl. Microbiol.* 46, 295–300.

González, R. N. 1996. Prototheca, yeast, and *Bacillus* as a cause of mastitis. In National Mastitis Council (US). Meeting (USA).

Günther, J., Koczan, D., Yang, W., Nürnberg, G., Repsilber, D., Schuberth, H. J., ... & Seyfert, H. M. 2009. Assessment of the immune capacity of mammary epithelial cells: comparison with mammary tissue after challenge with *Escherichia coli*. *Veterinary research*, 40(4), 1-14.

Hancock, R. E., Nijnik, A., & Philpott, D. J. 2012. Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. *Nature Reviews Microbiology*, 10(4), 243-254.

Hogeveen, H., Pyorala, S., Persson Waller, K., Hogan, J. S., Lam, T. J. G. M., Oliver, S. P., ... & Hillerton, J. E. 2011. Current status and future challenges in mastitis research. In *Proceedings of the Annual Meeting of the National Mastitis Council*.

Hogan, J. S., Gonzalez, R. N., Harmon, R. J., Nickerson, S. C., Oliver, S. P., Pankey, J. W. & Smith, K. L. 1999. *Laboratory Handbook on Bovine mastitis*. VERONA, WI: NMC.

Howard, P. 2006. Mastitis pathogens present in bulk tank milk from seven dairy herds in the Waikato region, New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, 54(1), 41-43.

IFCN. 2016. Vision of the dairy world in 2025. Recuperado de: http://www.ifcndairy.org/media/downloads/20160928_IFCN-Article_Long-term-Dairy-Outlook.pdf

Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). 2016. Base de datos sin publicar.

Jayarao, B. M., & Wang, L. 1999. A study on the prevalence of gram-negative bacteria in bulk tank milk. *Journal of Dairy Science*, 82(12), 2620-2624.

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. *Journal of Dairy Science*, 87(10), 3561-3573.

Jones, G. M., & Bailey, T. L. 2009. Understanding the basics of mastitis. College of Veterinary Medicine, Virginia Tech.

Jørgensen, H. J., A. B. Nordstoga, S. Sviland, R. N. Zadoks, L. Sølverød, B. Kvitle, and T. Mørk. 2016. *Streptococcus agalactiae* in the environment of bovine dairy herds – rewriting the textbooks? *Vet. Microbiol.* 184:64–72.

Katholm, J., Bennedsgaard, T. W., Koskinen, M. T., & Rattenborg, E. 2012. Quality of bulk tank milk samples from Danish dairy herds based on real-time polymerase chain reaction identification of mastitis pathogens. *Journal of dairy science*, 95(10), 5702-5708.

Keefe, G., 2010. Control of mastitis. P 43 – 52. En: *Memorias VII Seminario Internacional en competitividad en carne y leche*. Colanta, Medellín Colombia.

Keefe, G. P. 1997. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. *The Canadian Veterinary Journal*, 38(7), 429.

Le Maréchal, C., Thiéry, R., Vautor, E., & Le Loir, Y. 2011. Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products—a review. *Dairy science & technology*, 91(3), 247-282.

Lutzow, Y. C. S., Donaldson, L., Gray, C. P., Vuocolo, T., Pearson, R. D., Reverter, A., ... & Tellam, R. L. 2008. Identification of immune genes and proteins involved in the response of bovine mammary tissue to *Staphylococcus aureus* infection. *BMC veterinary research*, 4(1), 1.

Martínez, G. R. 2006. Comportamiento de la mastitis bovina y su impacto económico en algunos hatos de la Sabana de Bogotá, Colombia. *Revista Medicina Veterinaria*, (12), 35-55.

Mekibib, B., Furgasa, M., Abunna, F., Megersa, B., & Regassa, A. 2010. Bovine mastitis: Prevalence, risk factors and major pathogens in dairy farms of Holeta town, central Ethiopia. *Veterinary World*, 3(9), 397-403.

Mira, C. S., Della Libera, A. M. M. P., Souza, F. N., & Blagitz, M. G. 2013. Correlation between automatic somatic cell count and the percentage of neutrophils through flow cytometry and cyto centrifugation technique. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 65(5), 1403-1408.

Mitterhuemer, S., Petzl, W., Krebs, S., Mehne, D., Klanner, A., Wolf, E., ... & Blum, H. 2010. *Escherichia coli* infection induces distinct local and systemic transcriptome responses in the mammary gland. *BMC genomics*, 11(1), 138.

Molineri, A. I., Signorini, M. L., Cuatrin, A. L., Canavesio, V. R., Neder, V. E., Russi, N. B., ... & Calvino, L. F. 2009. Calidad bacteriológica y relación entre grupos bacterianos en leche de tanque de frío. *FAVE Sección Ciencias Veterinarias*, 8(2), 75-86.

Mora, M. G., Vargas, B., Romero, J. J., & Camacho, J. (2015). Factores de riesgo para la incidencia de mastitis clínica en ganado lechero de Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 39(2).

Moreno Martínez, J. A. 2014. Evaluación de buenas prácticas ganaderas y de ordeño a pequeños productores de leche de 7 veredas del municipio de Tunja. *Revista Lasallista de Investigación*.

Müller, E. E. 2002. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. *Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil*, 2, 206-217.

National Mastitis Council. 1999. *Laboratory Handbook on Bovine Mastitis*. Website: www.nmconline.org.

Nero, L. A., Mattos, M. D., Beloti, V., Barros, M. D. A., Pinto, J. P. A. N., Andrade, N. J. D., ... & Franco, B. D. G. M. 2005. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25(1), 191-195.

Normativa Nº 62, de 29 de Dezembro de 2011. Disponible en: http://www.leitedascrianças.pr.gov.br/arquivos/File/legislacao/IN62_2011_MAPA.pdf.

Ortiz R., T. A. 2014. Evaluación de la calidad higiénica, sanitaria e inocua, de la leche de tanque en hatos lecheros del Oriente y Norte de Antioquia. *Revista Lasallista de Investigación*.

Ortiz, Z., & Vera, A. 2006. Recuento de células somáticas en hatos lecheros de diferente nivel tecnológico en Arequipa. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 17(2), 104-107.

Patiño B., R. E. 2012. Detección de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157: H7 y *Listeria monocytogenes*, en muestras de leche bovina del sistema de producción doble propósito colombiano.

Piepers, S., De Meulemeester, L., de Kruif, A., Opsomer, G., Barkema, H. W., & De Vlieghe, S. 2007. Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium. *Journal of Dairy Research*, 74(04), 478-483.

Pieterse, R. y Todorov, S. 2010. Bacteriocins - Exploring alternatives to antibiotics in mastitis treatment. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41:542-562.

Posada A., S., Olivera A., M., Restrepo, J. E., & Loaiza, E. T. 2010. Caracterización del ordeño manual e identificación de puntos críticos de control para la calidad higiénica de la leche en una finca del norte de Antioquia. *Revista Lasallista de Investigación*.

Ramírez, N., Gaviria, G., Arroyave, O., Sierra, B., & Benjumea, J. 2009. Prevalencia de mastitis en vacas lecheras lactantes en el municipio de San Pedro de los Milagros, Antioquia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias (Colombian journal of animal science and veterinary medicine)*, 14(1), 76-87.

Ramírez, G., N., Correa L., G., & Echeverry, Z., J., J. 2012. Efecto del intervalo entre ordeños sobre el recuento de células somáticas en vacas holstein en condiciones tropicales. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*; Vol. 64, núm. 1 (2011); 5909-5916.

Ramírez, N., Gaviria, G., Arroyave, O., Sierra, B., & Benjumea, J. 2016. Prevalencia de mastitis en vacas lecheras lactantes en el municipio de San Pedro de los Milagros, Antioquia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 14(1), 76-87.

Ramírez Vásquez, N. F. 2013. Determinación de factores de riesgo y etiología microbiana de la mastitis bovina en hatos lecheros de seis municipios del altiplano norte antioqueño. 2009-2010 (Doctoral dissertation, Doctorado en Ciencias Animales).

Reneau, J.K., Bey, R.F., 2007. Milk quality and free Stall bedding management. In: *Natl. Mastitis Council. Reg. Mtg. Proc., Natl. Mastitis Council Inc., Madison, WI/Visalia, CA*, pp. 10-17.

- Revelli, G. R., Sbodio, O. A., & Tercero, E. J. 2011. Estudio y evolución de la calidad de leche cruda en tambos de la zona noroeste de Santa Fe y sur de Santiago del Estero, Argentina (1993-2009). *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 37(2), 128-139.
- Reyes, J., Sanchez, J., Stryhn, H., Ortiz, T., Olivera, M., & Keefe, G. P. 2017. Influence of milking method, disinfection and herd management practices on bulk tank milk somatic cell counts in tropical dairy herds in Colombia. *The Veterinary Journal*, 220, 34-39.
- Riekerink, R. G. M. O., Barkema, H. W., Veenstra, S., Poole, D. E., Dingwell, R. T., & Keefe, G. P. 2006. Prevalence of contagious mastitis pathogens in bulk tank milk in Prince Edward Island. *Canadian veterinary journal*, 47(6), 567.
- Riekerink, R. O., Barkema, H. W., & Stryhn, H. 2007. The effect of season on somatic cell count and the incidence of clinical mastitis. *Journal of dairy science*, 90(4), 1704-1715.
- Royster, E., & Wagner, S. 2015. Treatment of Mastitis in Cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 31(1), 17-46.
- Rysanek, D., Babak, V., & Zouharova, M. 2007. Bulk tank milk somatic cell count and sources of raw milk contamination with mastitis pathogens. *Veterinarni Medicina-praha* 52(6), 223.
- Ryšánek, D., Zouharová, M., & Babák, V. 2009. Major mammary pathogens as contributors to total bacterial counts in raw milk. *Acta Veterinaria Brno*, 78(3), 455-461.
- Sayed, S. M., & El-Hafeez, M. M. A. 2009. Bacteriological studies on pathogens causing sub-clinical mastitis in Holstein-Friesian dairy cows in Assiut governorate. *Assiut Veterinary Medical Journal*, 55(120), 46-58.
- Schukken, Y. H., Bard D., Hertl J., Gr Hn Y. T. 2010. Correlated time to event data: Modeling repeated clinical mastitis data from dairy cattle in New York State. *Preventive Veterinary Medicine* 97(3):150-156.
- Schukken, Y. H., González, R. N., Tikofsky, L. L., Schulte, H. F., Santisteban, C. G., Welcome, F. L., ... & Zadoks, R. N. 2009. *SCN* mastitis: Nothing to worry about?. *Veterinary microbiology*, 134(1), 9-14.
- 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. *Veterinary research*, 34(5), 579-596.
- Smith, K. L., & Hogan, J. S. 2008. Environmental mastitis: Know your opponent. In *Proc. Regional Meeting of the National Mastitis Council* (pp. 1-7).

Suriyasathaporn, W., Vinitketkumnuen, U., & Chewonarin, T. 2010. Relationships among malondialdehyde, milk compositions, and somatic cell count in milk from bulk tank. *Sonklanakar Journal of Science and Technology*, 32(1), 23.

Szumilas, M. 2010. Explaining Odds Ratios. *J Can Acad Child Adolesc Psychiatry*, 19:3

Torkar, K. G., & Teger, S. G. 2008. The microbiological quality of raw milk after introducing the two day's milk collecting system. *Acta Agri. Slovenica*, 92(1), 61-74.

Valero-Leal, K., Valbuena, E., Chacón, F., Olivares, Y., Castro, G., & Briñez, W. 2010. Patógenos contagiosos y ambientales aislados de cuartos mamarios con mastitis subclínica de alto riesgo en tres fincas del estado Zulia. *Revista Científica*, 20(5), 498-505.

Vásquez, F., J., 2012. Pérdidas económicas asociadas a la mastitis clínica. P 73 – 80. En: *Memorias VIII Seminario Internacional de leche y carne*. Colanta, Medellín.

Vásquez, F. C. M., Martínez, G. R., Mancera, V. M. M., Ávila, L. E. O., & Vargas, M. R. 2007. Análisis microbiológico y su relación con la calidad higiénica y sanitaria de la leche producida en la región del Alto de Chicamocha (departamento de Boyacá). *Revista de Medicina Veterinaria*, (14), 61-83.

Vásquez, J. F., Loaiza, E. T., & Olivera, M. 2012. Calidad higiénica y sanitaria de leche cruda acopiada en diferentes regiones colombianas. *Orinoquía*, 16(2), 13-23.

Vásquez, N. R., Henao, O. A., Cerón-Muñoz, M., Jaramillo, M., Cerón, J., & Palacio, L. G. 2011. Factores asociados a mastitis en vacas de la microcuenca lechera del altiplano norte de Antioquia, Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*, 22, 31-42.

Velasco-Bolaños, J., Cobo, C., Duque, P. C., Villa, N. A., Lasso, L., & Ceballos, A. 2014. Prevalencia y Factores de Riesgo para *Streptococcus agalactiae* en Tanques de Leche en el Departamento de Caldas, Colombia.

Vélez, J. R. 2016. *Streptococcus agalactiae* subclinical mastitis epidemiology and control in colombian dairy herds (Doctoral dissertation, University of Prince Edward Island).

Watts, J. L. 1988. Etiological agents of bovine mastitis. *Veterinary microbiology*, 16(1), 41-66.

Wenz, J. R., Jensen, S. M., Lombard, J. E., Wagner, B. A., & Dinsmore, R. P. 2007. Herd management practices and their association with bulk tank somatic cell count on United States dairy operations. *Journal of dairy science*, 90(8), 3652-3659.

Zárate, N. E. V. 2012. Control de mastitis bovina utilizando dos productos naturales para Dipping. Período primavera-verano. Disertación de Maestría. Universidad Austral de Chile.

Zucali, M., Bava, L., Tamburini, A., Brasca, M., Vanoni, L., & Sandrucci, A. 2011. Effects of season, milking routine and cow cleanliness on bacterial and somatic cell counts of bulk tank milk. *Journal of dairy research*, 78(04), 436-441.