

Correlación entre perfil fisicoquímico, carga microbiológica y conteo de células somáticas en leche bovina

Falfan -Araujo Karol Adhara¹, Patiño-Cornejo Itzel Abigail¹, Gómez-Ortega Israel Valentín², Silva-Silva Juan Jesús¹, Luján-Rodríguez Angela Gabriela², Salas-Mendoza Angélica María¹, Rojas-González Servando², Rodríguez-Hernández Gabriela^{1*}

¹Universidad de Guanajuato. División de Ciencias de la Vida. Departamento de Alimentos. ²Universidad de Guanajuato. División de Ciencias de la Vida. Departamento de Medicina Veterinaria y Zootecnia. gabriela.rodriguez@ugto.mx*

Resumen

La leche es la secreción natural de las glándulas mamarias de los mamíferos, excluido el calostro; en la leche de vaca debe cumplir con especificaciones para el consumidor obteniendo así leche inocua y de calidad. Las características fisicoquímicas proporcionan información sobre la composición de la leche, las características microbiológicas una visión de la microbiota prevaleciendo microorganismos benéficos hasta patógenos. La mastitis es una infección que se origina en las glándulas secretoras de leche, su identificación tiene relación directa al conteo de células somáticas en su mayoría leucocitos. En el presente estudio, se recolectaron tres muestras de leche de diferentes ranchos de la ciudad de Irapuato, Guanajuato. Se realizó la prueba de California para la identificación de mastitis, posteriormente a cada muestra se le efectuó un perfil fisicoquímico, un análisis microbiológico para bacterias mesófilas aerobias, coliformes totales, mohos y levaduras, siguiendo lo establecido por las normas oficiales mexicanas; e identificación y conteo de células somáticas bajo microscopio empleando el colorante azul de metileno. Para los resultados se aplicó un procedimiento de modelo lineal general. La muestra uno presentó mayor crecimiento microbiano con respecto a la muestra dos y tres, para el perfil fisicoquímico se obtuvieron diferencias significativas entre las tres muestras; en las células somáticas se determinó que la muestra uno y dos provinieron de ubres sanas ya que sus valores están por debajo de 200,000 células/mL, mientras la muestra tres se encontró por debajo de 100,000 células/mL, esto representa que las vacas analizadas no presentan mastitis. Adicionalmente se identificaron fuertes correlaciones entre las variables fisicoquímicas, microbiológicas y de conteo de células somáticas en las muestras de leche analizadas.

Palabras clave: vaca, leche, microbiota, mastitis.

Introducción

La leche de vaca es uno de los productos alimentarios de la cual se requiere una buena calidad, tanto en su obtención y procesamiento, pues de este se derivan más subproductos y es considerada como un alimento funcional, gracias a sus beneficios que genera en la nutrición y salud (CANILEC, 2011). Según la Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, se define como leche, a la secreción natural de las glándulas mamarias de las vacas sanas o de cualquier otra especie animal, excluido el calostro. La leche de vaca tiene como componentes principales el agua, el cual representa del 82-82.5% de la leche, los sólidos no grasos casi se aproximan al 9% (proteína, vitaminas, lactosa, minerales) y la grasa hasta un 3.4% (Agudelo y Bedoya, 2005). La leche debe de cumplir con disposiciones y requisitos establecidos necesarios para la seguridad de los consumidores. La Norma Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2012, estipula determinaciones fisicoquímicas, tales como proteína, sólidos no grasos, densidad, punto crioscópico, lactosa, grasa y pH; las cuales son de importancia para asegurar la calidad de la composición de la leche. La leche cuenta con una microbiota diversa, debido a su composición, donde se logran identificar microorganismos beneficiosos (bacterias lácticas) y patógenos, estos últimos siendo los causantes de muchas infecciones al consumir leche contaminada. De esta manera se han ido generando restricciones y especificaciones. Dentro de la Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, se encuentran regulaciones sobre la carga microbiana que debe cumplir la leche, como el recuento y la ausencia de microorganismos.

Uno de los problemas más comunes en la contaminación y pérdida de calidad nutricional y de inocuidad de la leche es debido a la mastitis, la cual es una enfermedad de las glándulas mamarias de ganado productor de leche. Se deriva del término *mast* = mama; *itis* = inflamación, esta enfermedad depende de ciertos factores, como la naturaleza del patógeno causante, salud inmunológica, estado de lactancia, la edad y raza. La identificación de la mastitis es posible mediante pruebas fisicoquímicas y microbiológicas, una de las más fáciles y rápidas es la Prueba de mastitis de California o mediante pruebas de pH (Viguiet et. al, 2009). La identificación de mastitis por medio del conteo de células somáticas en la leche, en su mayoría son leucocitos (neutrófilos), los cuales pueden aumentar según la gravedad de una infección del ganado lechero; estas células son utilizadas como indicador, dado que contribuyen a combatir la enfermedad y reparar tejidos dañados (Alhussien y Dang, 2018). El generar los análisis adecuados en leche, garantiza la seguridad de consumirla, por lo que, el presente estudio relaciona los perfiles de diferentes leches bovinas, mediante la determinación de su análisis fisicoquímico, carga microbiológica y conteo de células somáticas para establecer una correlación entre dichas variables.

Metodología

Se recolectaron muestras de leche de vacas (*Bos Taurus*) raza Holstein, de diferentes ranchos de la ciudad de Irapuato, Guanajuato, que se sometieron a análisis fisicoquímicos, microbiológicos y de determinación indirecta de mastitis por medio de Conteo de células somáticas y prueba de California.

Análisis fisicoquímico.

Se realizó el análisis fisicoquímico de cada muestra de leche de vaca, con el equipo Lactoscan SA-50 (Bulgaria), determinado las variables siguientes: grasa, sólidos no grasos (SNG), densidad, lactosa, sólidos, proteína, sólidos totales, agua añadida, punto de congelación, conductividad y pH. Todos estos parámetros se determinaron por triplicado.

Análisis microbiológico.

Los análisis microbiológicos se efectuaron conforme las normas oficiales mexicanas siguientes: la NOM-110-SSA1-1994, para la preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico; la NOM-092-SSA1-1994, para conteo de bacterias mesófilas aerobias en placa; la NOM-111-SSA1-1994, para cuantificación de mohos y levaduras en alimentos; y la NOM-113-SSA1-1994, para cuantificación de bacterias coliformes totales. Se esterilizó el material, el cual se dispuso en la campana de flujo laminar, que anticipadamente se desinfectó con solución de alcohol (70%) y luz ultravioleta para eliminar riesgos de contaminación. Se hicieron diluciones seriadas de cada una de las muestras de leche en el buffer de fosfato de 1:10 hasta 1:100,000, los cuales se inocularon por triplicado a los agaros rojo violeta bilis, papa dextrosa y métodos cuenta estándar y posteriormente fueron incubados, las bacterias a 36 °C por 48 horas y los hongos a 25 °C durante 5 días, después se efectuó el conteo de unidades formadoras de colonias y con esto se estipuló la concentración de cada grupo de microorganismos en las respectivas muestras de leche.

Conteo de Células somáticas.

Las muestras se diluyeron 1 a 1.25 con el colorante de azul de metileno, una vez mezclado se colocaron 30µL en el portaobjetos para su posterior recuento en el microscopio Leica DM500, con el objetivo de 40x, según la metodología de Caggiano et al., (2017). Adicionalmente se realizaron conteos con el colorante de Turck y con Cámara de Neubauer acorde a Zajác et al., (2019).

Prueba California.

Se realizó la prueba California para determinar mastitis, en dicho proceso se ordeña a la vaca, procurando que la leche procedente de cada cuarto se contenga en el espacio correspondiente en la paleta, ya en la paleta se depositó el reactivo California (púrpura de Bromocresol) en igual medida a la leche (5 ml, dilución 1:1), se mezcló en movimientos circulares por 20 segundos, donde; negativo: no hay espesamiento en la muestra, traza (posible infección): ligero espesamiento en la muestra, la reacción traza parece desvanecerse con el movimiento, posición (infección evidente): inmediato espesamiento con formación de gel que permanece aún si se realiza movimiento en la muestra (Perrin et al., 1997).

Análisis estadístico.

Con el software SAS (2006), se utilizó el procedimiento GLM (Modelo lineal general) y un análisis de diferencias de medias por el método de Tukey, para cada una de las variables analizadas. Adicionalmente se realizó una correlación de Pearson entre las variables fisicoquímicas, microbiológicas y de células somáticas con el procedimiento CORR.

Resultados

Análisis Físicoquímico

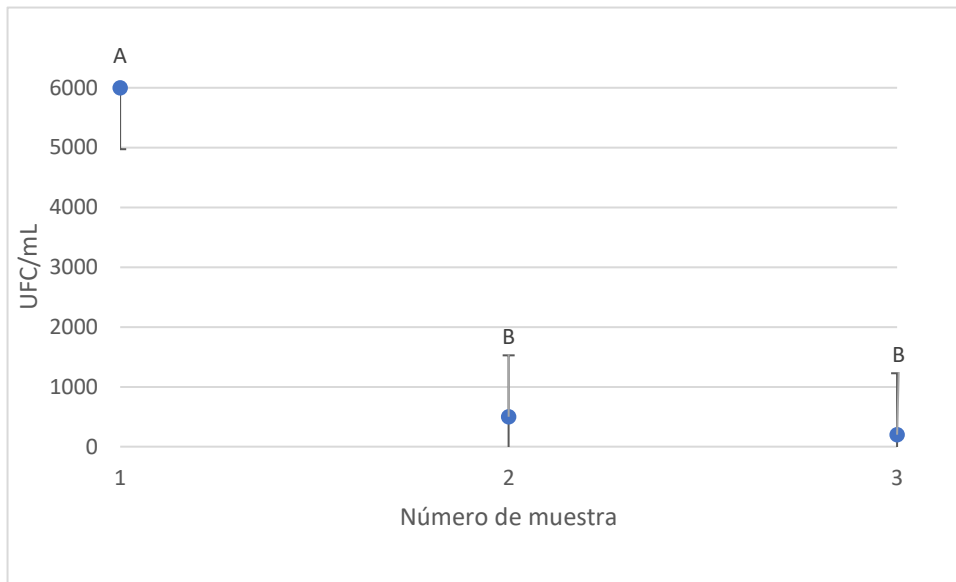
Se obtuvieron diferencias significativas entre las tres muestras analizadas (Tabla 1), en los parámetros de grasa, SNG, densidad, lactosa, proteína, sólidos totales y pH. Cabe resaltar que en el agua adicionada se pudo notar que la muestra dos estaba adulterada, esto se puede mostrar claramente en la disminución del punto de congelación de la misma, ya que, el valor presentado, no coincide con los rangos marcados de acuerdo con la NOM-155-SCFI-2012 (valor del punto de congelación °C por debajo de -0.515 y -0.536).

Tabla 1. Parámetros físicoquímicos en muestras de leche cruda de vaca.

Variable	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Grasa	0.75 ± 0.00 ^C	1.67 ± 0.10 ^B	2.67 ± 0.10 ^A
Sólidos no grasos	9.82 ± 0.00 ^A	7.59 ± 0.01 ^C	8.75 ± 0.03 ^B
Densidad	36.47 ± 0.03 ^A	27.27 ± 0.09 ^C	30.79 ± 0.19 ^B
Lactosa	5.40 ± 0.00 ^A	4.17 ± 0.01 ^C	4.81 ± 0.01 ^B
Proteína	3.61 ± 0.00 ^A	2.78 ± 0.00 ^C	3.20 ± 0.01 ^B
Sólidos totales	10.57 ± 0.00 ^B	9.26 ± 0.11 ^C	11.43 ± 0.07 ^A
Agua adicionada	0.00 ± 0.00 ^B	9.80 ± 0.19 ^A	0.00 ± 0.00 ^B
Punto de congelación	-0.61 ± 0.00 ^C	-0.46 ± 0.00 ^A	-0.55 ± 0.00 ^B
pH	6.81 ± 0.02 ^A	6.50 ± 0.00 ^C	6.66 ± 0.00 ^B
Conductividad	4.81 ± 0.01 ^A	4.62 ± 0.10 ^A	3.84 ± 0.10 ^B

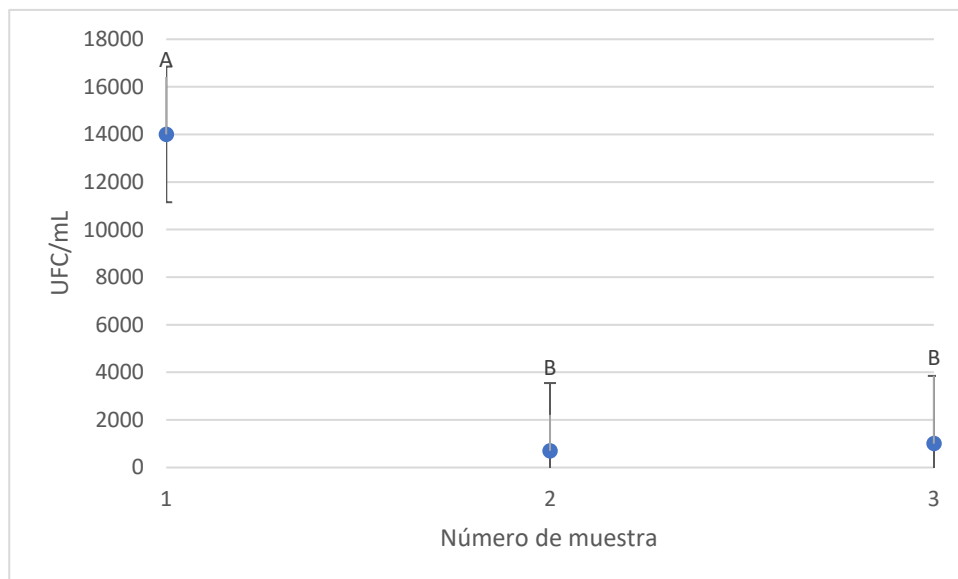
Análisis Microbiológico

Para las evaluaciones microbiológicas, se presentaron diferencias significativas entre las tres muestras analizadas, específicamente para la cuantificación de hongos (Gráfica 1), en las muestras dos y tres la concentración se presentó baja con respecto a la muestra uno, que tiene una población estadísticamente más alta. No obstante, al comparar con la NOM-243-SSA1-2010, marca un límite de 500 UFC/g ó mL para quesos frescos y/o madurados (ya que no existe marcado límite para hongos en leche) y en este sentido ninguno de las tres muestras analizadas cumplirían dicho parámetro de calidad.



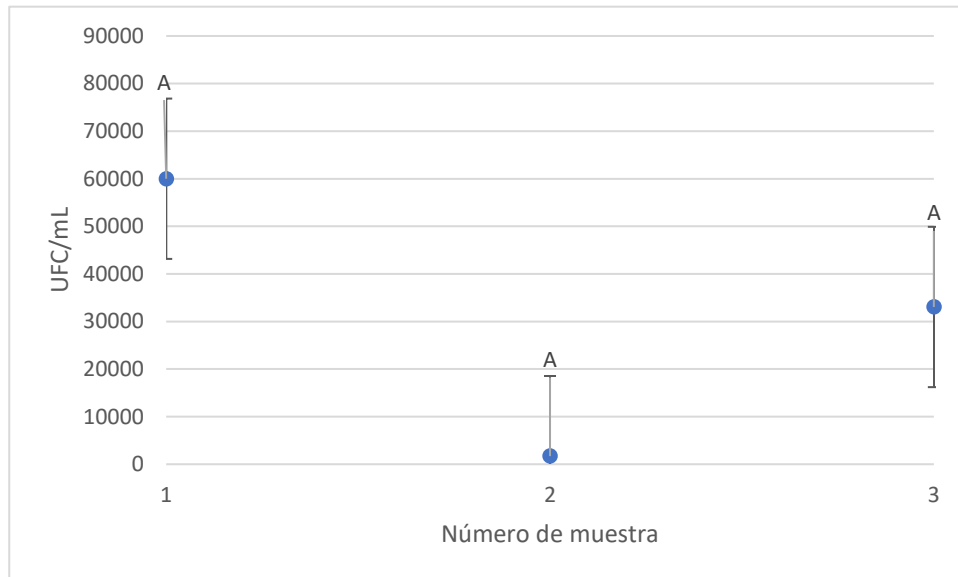
Gráfica 1. Concentración de hongos dada en unidades formadoras de colonia por mililitro de leche. Los valores corresponden al promedio y desviación estándar. ^{A,B} literales diferentes indican diferencias significativas entre muestras de leche ($p < 0.05$).

Relativo a la cuantificación de las bacterias coliformes totales, también se identificaron diferencias significativas entre las tres muestras analizadas (Gráfica 2), siendo más elevado el conteo en la muestra uno. Adicionalmente, cabe mencionar que la NOM-243-SSA1-2010, marca un límite de ≤ 10 UFC/mL en leche pasteurizada (ya que no existe indicación en la norma para leche cruda), con respecto a las tres muestras analizadas, ninguna de ellas cumple con este parámetro.



Gráfica 2. Concentración de bacterias coliformes totales, dadas en unidades formadoras de colonia por mililitro de leche. Los valores corresponden al promedio y desviación estándar. ^{A,B} literales diferentes indican diferencias significativas entre muestras de leche ($p < 0.05$).

Con respecto a la cuantificación de bacterias mesófilas aerobias, no se identificaron diferencias significativas entre las muestras de leche (Gráfica 3). Adicionalmente acorde al PROY-NMX-F-700-COFOCALEC-2019, las tres muestras analizadas fueron catalogadas bajo la Clase 1 (menos de 100 000 UFC/mL), de cuatro Clases totales (Clase 2 de 101 000 a 300 000 UFC/mL, Clase 3 de 301 000 a 599 000 UFC/mL y Clase 4 de 600 000 a 1 200 000 UFC/mL) en la escala de especificaciones sanitarias para leche cruda de vaca.



Gráfica 3: Concentración de bacterias mesófilas aerobias, dadas en unidades formadoras de colonia por mililitro de leche. Los valores corresponden al promedio y desviación estándar. Sin diferencias significativas entre muestras de leche ($p > 0.05$).

Conteo de Células Somáticas

Acorde a la determinación de células somáticas en las muestras de leche (Figura 1), se presentaron diferencias significativas entre las muestras analizadas (Tabla 2). No obstante, de acuerdo con los resultados presentados, se puede decir que todas las muestras provienen de ubres sanas, ya que sus valores están por debajo de las 200,000 células/mL (Villalobos et al., 2006); destacando que la muestra tres, tiene una concentración menor a 100,000 células/mL, esto a su vez, puede representar que el animal (vaca), se encuentre en su primera lactancia de acuerdo con la cita revisada (Mora et al., 2016).



Figura 1. Célula Somática teñida con reactivo Turck, que se visualizó en el microscopio óptico.

Tabla 2. Conteo de células somáticas en leche cruda de vaca.

Número de muestra	Células somáticas obtenidas (Células/mL)	Rangos de acuerdo con Villalobos et al., 2006.
Muestra 1	19875 ± 3535.53 ^A	Ubres sanas < 200 000 células/ mL Rechazo de la leche >450 000 células/mL
Muestra 2	11250 ± 530.33 ^{AB}	Ubres sanas < 200 000 células/ mL Rechazo de la leche >450 000 células/mL
Muestra 3	4750 ± 353.55 ^B	Ubres sanas < 200 000 células/ mL Rechazo de la leche >450 000 células/mL

Los valores corresponden al promedio y desviación estándar. ^{A,B} literales diferentes indican diferencias significativas entre muestras de leche ($p < 0.05$).

Prueba de california

Esta determinación se realizó solamente en una muestra de leche adicional, ya que de los ranchos monitoreados no se consiguió autorización para ordeñar directamente las vacas, por tanto, estos resultados no se correlacionaron con las demás variables determinadas en este estudio. Con respecto a la única muestra analizada (Figura 2), se observó la presencia de coágulos viscosos en el cuarto anterior izquierdo, dando positivo a mastitis (Tabla 3). Sin embargo, con respecto a la evaluación visual de las ubres de la vaca, no se observó ninguna anomalía, por tanto, se sugiere una mastitis subclínica, la cual para ser confirmada se tiene que apoyar del uso de técnicas de laboratorio como la medición de conteo de células somáticas y el cultivo microbiológico que son necesarias para detectar inflamación e infección (Bedolla et al., 2008).



Figura 2. Prueba de California en leche bronca de vaca, la segunda se muestra positiva a mastitis.

Tabla 3. Prueba de California para identificación de mastitis en leche cruda de vaca.

Glándula mamaria (Cuarto)	Posición	Resultados	Interpretación	Instrucciones de interpretación
1	Anterior Derecho	Sin determinar	Sin determinar	Ausente de coágulos o gel (-) Coágulos adheridos a las paredes (+) Coágulos viscosos (++) Gel espeso (++)
2	Anterior Izquierdo	(++)	Coágulos viscosos	
3	Posterior Derecho	(-)	Ausentes de coágulos o gel	
4	Posterior Izquierdo	(-)	Ausentes de coágulos o gel	

Correlación de Pearson

De la correlación entre variables fisicoquímicas, microbiológicas y de células somáticas en las muestras de leche cruda de vaca, se encontraron fuertes relaciones tanto directamente como inversamente proporcionales, en la mayoría de las variables analizadas; en la Tabla 4, se muestran todas ellas y se resalta con negritas las que fueron mayor al 0.75 y significativas ($p < 0.05$), de las cuales, se pueden destacar la alta correlación inversamente proporcional (de -0.87 a -0.99), entre el punto de congelación (PCO) y agua adicionada (ADD) con los diferentes sólidos no grasos de la leche (SNG). Así como, la fuerte correlación directa entre las células somáticas (CES) con las variables de conductividad de la leche (CON), la presencia de hongos (HON) y bacterias coliformes totales (BCT) (0.88, 0.83 a 0.89 respectivamente). Adicionalmente, que en los tres tipos de microorganismos cuantificados (HON, BCT y BMA) se establecen correlaciones directas (todas mayores al 0.82), con los sólidos no grasos de la leche, tanto los globales (SNG), como los desglosados, es decir, densidad (DEN), lactosa (LAC) y proteína (PRO), lo cual, establece que a mayor presencia de estos nutrientes existe un mayor crecimiento microbiano. Así también, se observó una alta correlación inversamente proporcional entre el porcentaje de grasa (GRA) de la leche con la presencia de hongos (HON) (-0.84) y bacterias coliformes totales (BCT) (-0.84). Dichas observaciones coinciden con lo referido en el PROY-NMX-F-700-COFOCALEC-2019, donde se indica que las características fisicoquímicas y de composición de la leche ofrecen el sustrato adecuado para el crecimiento de microorganismos diversos en los cuales pueden incluirse los patógenos.

Tabla 4. Correlaciones de Pearson entre variables fisicoquímicas, microbiológicas y de células somáticas de leche bronca de vaca.

	GRA	SNG	DEN	LAC	PRO	ST	ADD	PCO	pH	CON	HON	BCT	BMA	CES
GRA	---	-0.45	-0.59	-0.46	-0.47	0.41	-0.02	0.40	-0.46	-0.93	-0.84	-0.84	-0.42	-0.97
SNG		---	0.98	0.99	0.99	0.61	-0.87	-0.99	0.99	0.16	0.82	0.85	0.94	0.53
DEN			---	0.98	0.99	0.48	-0.79	-0.97	0.98	0.31	0.89	0.92	0.92	0.66
LAC				---	0.99	0.61	-0.87	-0.99	0.99	0.17	0.82	0.85	0.94	0.54
PRO					---	0.60	-0.86	-0.99	0.99	0.18	0.83	0.86	0.94	0.55
ST						---	-0.91	-0.66	0.60	-0.65	0.09	0.12	0.58	-0.30
ADD							---	0.94	-0.86	0.32	-0.46	-0.50	-0.83	-0.07
PCO								---	-0.99	-0.10	-0.79	-0.82	-0.94	-0.48
pH									---	0.17	0.84	0.85	0.93	0.53

CON										---	0.64	0.63	0.16	0.88
HON										---		0.96	0.76	0.83
BCT												---	0.79	0.89
BMA													---	0.48
CES														---

GRA: grasa, SNG: sólidos no grasos, DEN: densidad, LAC: lactosa, PRO: proteína, ST: sólidos totales, ADD: agua adicionada, PCO: punto de congelación, pH: potencial de hidrógeno, CON: conductividad, HON: hongos, BCT: bacterias coliformes totales, BMA: bacterias mesófilas aerobias, CES: células somáticas. Las correlaciones marcadas con negritas cumplen con el nivel de significancia ($p < 0.05$).

Conclusión

Del análisis de las muestras de leche cruda analizadas en el presente estudio se puede concluir que establecieron diferencias significativas entre ellas con respecto a los parámetros fisicoquímicos, microbiológicos y de conteo de células somáticas, resaltando que referente a la cuantificación de hongos y bacterias se presentaron muy elevados con respecto a los límites establecidos en las normas oficiales mexicanas correspondientes. Así también, se identificaron altas correlaciones tanto directa como indirectamente proporcionales (mayores a 0.75) entre las variables fisicoquímicas, microbiológicas y de conteo de células somáticas en las muestras de leche analizadas.

Bibliografía

- Agudelo, Gómez., D.A., Bedoya Mejía, O. (2005). Composición nutricional de la leche de ganado vacuno. Revista Lasallista de Investigación, 2(1), 38-42.
- Alhussien, M.N., Dang., AK. (2018). Células somáticas de la leche, factores que influyen en su liberación, perspectivas futuras y utilidad práctica en animales lecheros: una descripción general. Veterinary World, 11(5), 562-577.
- Bedolla, C., Ponce, L.M. (2008). Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera - Economic causalities inflicted by the bovine mastitis in the milk industry. Redvet, 9(4), 1-26.
- Caggiano, N., De Simone, E. (2017). Niveles de Glicosaminoglicanos en leche como indicador de salubridad mamaria en vacas Holstein.
- CANILEC, Cámara Nacional de Industriales de la Leche. (2011). Libro blanco de la leche. CANILEC. 1(1), 12.
- Mora, M.G., Vargas, B. Romero, J.J., Camacho, J. (2016). Efecto de factores genéticos y ambientales sobre el recuento de células somáticas en ganado lechero de Costa Rica.
- Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Diario Oficial de la federación. Recuperado de: https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4886029&fecha=12/12/1995#_ftn24 .
- Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, Bienes y servicios. Instalación y operación de la farmacovigilancia. Diario Oficial de la Federación. Recuperado de: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4883170&fecha=16/10/1995#gsc.tab=0.
- Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. Diario Oficial de la federación. Recuperado de: https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4881226&fecha=13/09/1995#gsc.tab=0.

Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. Diario Oficial de la federación. Recuperado de: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4869711&fecha=22/02/1995#gsc.tab=0.

Norma Oficial Mexicana. NOM-155-SCFI-2012. Leche-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. Diario Oficial de la Federación. Recuperado de: <https://www.dof.gob.mx/normasOficiales/4692/seeco/seeco.htm>.

Norma Oficial Mexicana. NOM-243-SSA1-2010. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. Diario Oficial de la Federación. Recuperado de: <https://dof.gob.mx/normasOficiales/4156/salud2a/salud2a.htm>.

Perrin, G.G., Mallereau, M.P., Lenfant, D., Baudry, C. (1997). Relationships between California mastitis test CMT and somatic cell counts in dairy goats. *Small Ruminant Research*. (26)167-170.

Proyecto de Norma Mexicana. PROY-NMX-F-700-COFOCALEC-2019, Sistema producto leche-alimento-lácteo-leche cruda de vaca -especificaciones fisicoquímicas, sanitarias y métodos de prueba.

SAS, Statistical Analysis System. (2006). Version 9.1.3 for Windows. SAS Institute Inc., Cary, N.C.

Viguier, C., Arora, S., Gilmartin, N., Welbeck, K., O'Kennedy, R. (2009). Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends in Biotechnology*, 27(8): 486-493. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.05.004>.

Villalobos, A.C., Vargas, Rodríguez C.F., Jiménez, Ramírez, M.P. (2006). Incidencia en el conteo de células somáticas de un sellador de barrera (yodo-povidona 0.26%) y un sellador convencional (yoduro 0.44%). *Agronomía mesoamericana*. (17) 207-212.

Zajác, P., Capla, J., Golian, J. (2019). *Direct microscopic somatic cell count*. Key Publishing. Slovakia.