

RELACIÓN DE RESULTADOS ENTRE PRUEBAS DE RESAZURINA Y CONTEO DE CÉLULAS SOMÁTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD HIGIÉNICA Y SANITARIA DE LA LECHE Y LOS EFECTOS DE ELEVADOS NÚMERO DE CÉLULAS SOMÁTICAS EN LA CALIDAD DE LA LECHE PROCESADA

RELATION OF RESULTS BETWEEN RESAZURINA TESTS AND COUNTING OF SOMATIC CELLS FOR DETERMINING THE HYGIENIC AND SANITARY QUALITY OF MILK AND THE EFFECTS OF ELEVATED NUMBER OF SOMATIC CELLS IN PROCESSED MILK QUALITY

ZEMANATE AVIRAMA, DAVID ALEJANDRO ¹ GRASS RAMÍREZ, JOSÉ FERNANDO ²

PALABRAS CLAVE:

Mastitis, células somáticas, conteo de células somáticas (CCS), caseína, enzimas proteolíticas y lipolíticas, hidrolización, potencial de oxido reducción.

KEY WORDS:

mastitis, somatic cells, counting of somatic cells, casein, proteolytic and lipolytic enzymes, hydrolyzation, oxide reduction potential.

RESUMEN

La Asociación de Productores de Leche de Sotaré ASPROLESO, ubicada en Paispamba, cabecera municipal de Sotaré (Cauca), conformada por alrededor de 150 campesinos de la región, desarrolla la actividad económica de producción, acopio, enfriamiento y comercialización de leche fresca. Como medida para valorar la calidad microbiológica aplica la prueba de resazurina en el laboratorio de control de calidad de la Asociación. Esto permite dar a los productores bonificaciones con el objetivo de reducir pérdidas económicas en la comercialización ante las industrias lácteas de la región, debido a la deficiente calidad microbiológica de la leche acopiada. Con el fin de buscar información acerca del origen de la alta carga microbiana se llevó a cabo la comparación de dos parámetros: resazurina y conteo de células somáticas en muestras de leche de ordeño de 65 productores. Para la determinación del primer parámetro se empleó una solución de resazurina al 0.005% (P/V) de concentración, en el laboratorio de control de calidad de ASPROLESO, y para el segundo, conteo de células somáticas por medio del sistema contador electrónico de partículas, se enviaron las muestras al Laboratorio Médico Veterinario (L.M.V) ubicado en Bogotá. El análisis de los resultados obtenidos expresa la no existencia de relación entre las dos pruebas.

ABSTRACT

The milking milk sample's analysis of 65 producers belonging to the Producers Association of Milk in Sotaré ASPROLESO, was done by means of resazurina

Recibido para evaluación: Diciembre 15 de 2004. Aprobado para publicación: Enero 25 de 2005.

1 Estudiante de pregrado de Ingeniería Agroindustrial. Universidad del Cauca.
2 Docente de Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad del Cauca.

Correspondencia: José Fernando Grass. e_mail: jfgrass@unicauca.edu.co

trials with solutions at 0.0005% (P/V) of concentration in the quality control laboratory of ASPROLESO, as well as the count of somatic cells by means of the electronic count system of particles in the Medical Veterinary Laboratory (L.M.V.) located on Bogotá, getting as a result the existence of non-relation between the two trials due to their different principles of reaction.

INTRODUCCION.

La leche es, según la literatura “el producto íntegro, no adulterado ni alterado y sin calostro, procedente de la ordeña higiénica, regular y completa de vacas sanas y bien nutridas” (1).

Por sus excelentes características nutritivas, la leche permite la multiplicación muy rápida de una gran variedad de microorganismos, convirtiéndola en el alimento que más fácilmente se altera.

Con el fin de determinar si existe alguna relación entre el conteo de células somáticas (C.C.S.) y los resultados de pruebas de resazurina, análisis realizado, para conocer el estado higiénico y sanitario de la leche por parte de las organizaciones lácteas, las cuales liquidan el valor de la misma con base en este resultado en el sistema de “pago por calidad” a sus proveedores, se determinaron estos dos parámetros a la par, teniendo como muestras de leche las obtenidas por productores de la Asociación de Productores de Leche de Sotará ASPROLESO en sus rutinas de ordeño.

TEORÍA.

La mastitis, es un proceso inflamatorio de origen infeccioso de la glándula mamaria que puede ser ocasionada por factores físicos, químicos, mecánicos o infecciosos, producido por varias clases de microorganismos, pero que, en el medio colombiano, por lo menos en el 85% de los casos, involucra a bacterias de los géneros *Streptococcus* y *Staphylococcus*. El resto pueden ser producidas por otras bacterias como *E coli*, *Pseudomonas spp*, *Corynebacterium*, y por mohos y levaduras. (2)

Las células somáticas, son células que se difunden desde la sangre a los tejidos y conductos de la glándula mamaria, como respuesta inflamatoria defensiva a una agresión traumática o, en la mayoría de los casos, infecciosa. Aproximadamente el 98% de esas células

son leucocitos y el 2% son células epiteliales de descamación por envejecimiento.

Estas son células de alto poder fagocítico (capacidad para ingerir las partículas invasoras) y con capacidad para liberar respuestas inespecíficas capaces de destruir gran número de los organismos invasores. Otra población importante en la defensa de la glándula está constituida por las mismas células epiteliales glandulares. Cuando estas mismas células mueren debido a la agresión bacteriana, se desprenden del tejido mamario arrastrando consigo gran cantidad de bacterias adheridas a ellas. (3)

Actualmente se determina este parámetro mediante el conteo de células somáticas, empleando para ello un contador electrónico de células, que es un instrumento capaz de contar y medir partículas en suspensión. El sistema está formado por los siguientes elementos:

1. Dos electrodos, uno en el interior de un tubo con un pequeño orificio que se introduce en la suspensión de partículas a contar, y un segundo electrodo que se introduce directamente en dicha suspensión. El tubo con el orificio está conectado a un manómetro de mercurio y a una bomba. El manómetro controla mediante el desplazamiento del mercurio la conexión y desconexión de los electrodos.

2. Un amplificador electrónico de la señal, un analizador de altura de los pulsos, y una escala, conectados a los electrodos.

Cuando la válvula que controla el manómetro se abre 0.5 ml de la suspensión entran en el interior del tubo por el pequeño orificio. Durante ese tiempo los electrodos están conectados y registran y transmiten al equipo de amplificación y análisis de la señal las oscilaciones de resistencia que detectan. Cada vez que una célula atraviesa el orificio se produce una variación de la resistencia proporcional al tamaño. Estos datos se registran y se analizan. (5)

Se han establecido como parámetros de referencia los siguientes:

CUADRO 1. Interpretación de CCS.

Número de células somáticas por mL (CS/mL)		Calificación
1	100.000	Excelente
100.001	250.000	Buena
250.001	500.000	Regular
500.001	1.000.000	Mala

Fuente: COTRINO, Víctor. 2004.

Con relación a la resazurina, ésta es un indicador de pH que vira entre 3,8 (anaranjado) a 6,5 (púrpura) Es una oxazona que imparte color azul a la leche normal. Por pérdida de oxígeno se reduce en dos etapas: en la primera pasa por diversas tonalidades de violeta hasta rojo-rosa, color éste que se atribuye a la formación de un compuesto denominado resorufina; a diferencia del azul de metileno esta etapa de reducción es irreversible, es decir, en contacto con el oxígeno del aire el color azul original no se restituye. Si la pérdida de oxígeno continúa, la reducción pasa a una segunda etapa reversible, en la cual la resorufina se reduce a dihidro-resorufina, compuesto incoloro que por oxidación puede pasar de nuevo a resorufina (rojo-rosa). (4)

La rapidez de la reducción está en proporción directa con la densidad bacteriana.

MATERIALES Y METODOS.

Materia Prima

Se utilizó la leche producida en el municipio de Sotará (Cauca), por los productores vinculados a ASPROLESO.

CUADRO 2. Interpretación de resultados de resazurina.

Calidad	Color	Calidad bacterial UFC/mL
Excelente	Azul celeste	< 100.000
Buena	Violeta azulado	100.000 a
Regular	Violeta rojizo	500.000
Mala	Rojo, rosa, incoloro	> 500.000

Fuente: Friesland de Colombia.

Equipos

Baño termostático, balanza analítica, autoclave, contador electrónico de partículas, pila refrigeradora.

Materiales y reactivos

Pipetas volumétricas de 1 y 10 mL, pipeteadores, recipientes de polipropileno esterilizados, gradillas, varillas de agitación, tubos de ensayo con tapa rosca, beakers de 100 y 200 mL, solución de resazurina al 0,005% p/v, líquido fijador.

Métodos de análisis.

Los dos métodos empleados fueron:

- Conteo de células somáticas CCS (método electrónico para contar partículas).
- Resazurina (método de óxido reducción).

Procedimiento experimental.

Debido a que los productores se encontraban dispersos en una amplia zona de la región de Sotará, era imposible el realizar la toma de muestra de ordeño por el personal técnico de ASPROLESO, por lo cual, a los productores se les capacitó y se les entregaron recipientes de polipropileno esterilizados para que ellos tomaran adecuadamente las muestras y las entregaran al centro de acopio o a los carros de recolección de leche. Una vez llegaban al laboratorio de control de calidad de ASPROLESO las muestras enviadas por los productores, éstas se fraccionaban para la determinación de los dos parámetros en estudio, como se explica a continuación.

Protocolo de toma de muestras para CCS.

El protocolo utilizado para CCS fue el siguiente:

- Se agitaron las muestras.
- Se tomaron 7 mL de leche de cada una de las muestras, con pipetas estériles para cada una.
- Se depositaron los 7 mL de leche en tubos de ensayo con líquido conservante, suministrados por el Laboratorio Médico Veterinario LMV. Figura 1.
- Se taparon los tubos de ensayo y se homogenizó la mezcla contenida.
- Se rotularon los tubos de ensayo.
- Se colocaron en refrigeración los tubos de ensayo, a 4 °C.

Las muestras refrigeradas despacharon, al Laboratorio Médico Veterinario ubicado en la ciudad de Bogotá, cumpliendo las siguientes pautas.

- Se aseguró que el tiempo transcurrido entre la toma de las muestras y la recepción en el laboratorio en Bogotá, no fuera mayor a 36 horas ya que esto causaría el deterioro de ellas.
- Se garantizó que las muestras estuvieran correctamente rotuladas e identificadas con marcador resistente al agua
- Se enviaron en cajas de icopor o térmicas, con hielo, para proporcionar ambiente de refrigeración.
- Se evitó que los tubos de ensayo entraran en contacto directo con el hielo.

Protocolo de toma de muestras para resazurina.

El protocolo utilizado para la prueba de la resazurina fue el siguiente:

- Se agitaban las muestras.
- Se tomaron 10 mL de leche de cada una de las muestras parciales, con pipetas estériles para cada una.
- Se depositaron los 10 mL de leche en tubos de ensayo y se rotulaban.
- Se adicionó a cada tubo de ensayo 1 mL de solución de resazurina al 0.005 % p/v.
- Se tapó el tubo y se homogenizó la mezcla contenida.
- Se rotularon los tubos de ensayo.
- Se incubaron las muestras en el baño termostático a 37 °C, durante 1 hora.
- Se observó el cambio de coloración y se comparó con la tabla patrón. Figura 3.
- Se realizó la clasificación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Una vez obtenidos los conteos de células somáticas y la valoración de la resazurina, se obtuvieron los siguientes resultados: (Cuadro 1 y 2)

De lo anterior se puede determinar que de las muestras analizadas a través de resazurina el 78.78% muestran una calificación de excelente calidad, (Cuadro 3) mientras que de acuerdo con el conteo de células somáticas (CCS) sólo se encuentran dentro de este rango un

FIGURA 1. Muestras de leche y tubos de ensayo con líquido conservante.



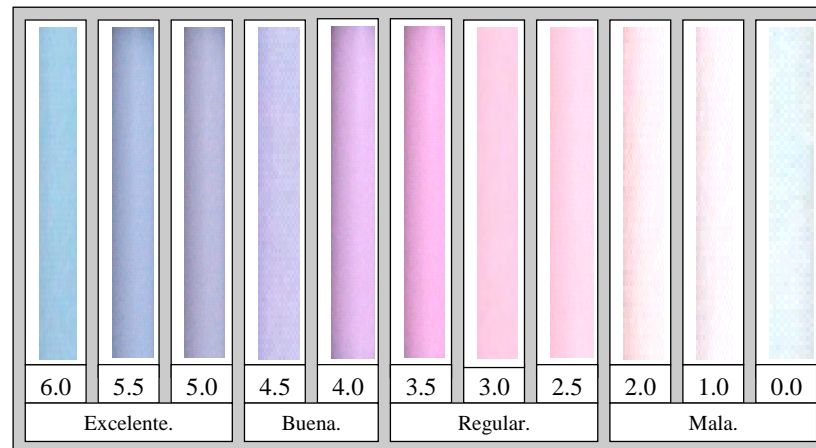
Fuente: El autor.

FIGURA 2. Toma de muestra de leche en tubos de ensayo con conservante



Fuente: El autor.

28.79% de éstas (Cuadro 4). Lo anterior puede ser explicado porque la resazurina es sólo un indicador del potencial de oxidación-reducción (Eh) del oxígeno disuelto en la leche y debido a la presencia en baja proporción de microorganismos aerobios y por su bajo consumo de oxígeno se produce una disminución lenta del potencial Eh al cabo del tiempo de duración de la prueba. Esto se refleja en una coloración azul al momento de realizar la lectura, lo que significa que el mayor número de bacterias presentes en este tipo de leche son de tipo anaerobio, conclusión a la cual se llega con base en los CCS y en la literatura consultada.

FIGURA 3. Tabla patrón de coloración**CUADRO 3.** Resultados de CCS

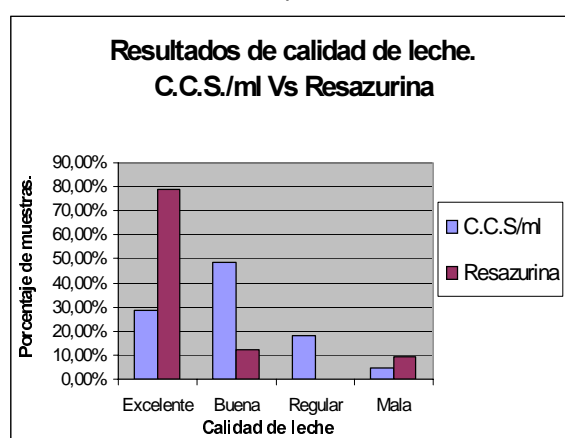
Calidad de leche	Muestras	Porcentaje
Excelente	19	28.79
Buena	32	48.49
Regular	12	18.19
Mala	3	4.54

Fuente: El autor.

Cuadro 4. Resultados de resazurina.

Calidad de leche	Muestras	Porcentaje
Excelente	52	78.78
Buena	8	12.12
Regular	0	0
Mala	6	9.09

Fuente: El autor.

FIGURA 4. Resultados de pruebas de resazurina.

Fuente: El autor.

Esta situación es evidente se en las leches con calificación tipo regular, pésima, mala y pobre, para las cuales los CCS arrojaron un 22.72%, mientras por prueba de resazurina estas leches solo arrojaron un 6.05 %. Esto indica que la prueba de la resazurina permite determinar condiciones múltiples de circunstancias higiénicas y bacteriológicas de la leche objeto de examen. Este complejo puede estar formado por tres tipos de integrantes: gérmenes acidificantes y reductores, en especial coli-aerogenes, estreptococos y estafilococos; otras bacterias, y células a consecuencia de la mastitis, los cuales no pueden ser identificadas por la resazurina debido al limitado mecanismo de reacción de la prueba.

Se ha demostrado que números elevados de células somáticas, como algunos de los encontrados en este estudio, afectan la composición de la leche, debido a los incrementos en la concentración de enzimas proteolíticas, también las llamadas enzimas tipo plasminas y lipolíticas, esto como consecuencia de la lisis sufrida por leucocitos y bacterias durante la acción de defensa del sistema intramamario contra las infecciones bacterianas.

Así es como la plasmina rompe la kappa-caseína en fragmentos ineficientes a la hora de la coagulación, disminuyendo la capacidad de formación de la cuajada, la firmeza y calidad del queso, debido a la hidrolización y alteración de la estructura de la micela de caseína (6) (de alto valor industrial), disminuyendo su proporción en la leche.

Así mismo, puede producir gelificación y deterioro tem-

prano de la leche ultrapasterizada debido a la reducción de la tolerancia de la leche a los tratamientos térmicos causada por cambios en el perfil mineral y en la proporción de lactosa porque la capacidad de filtración selectiva ejercida por el epitelio mamario aumenta varias veces las concentraciones de sodio y cloro y disminuye las concentraciones de calcio, fosfatos, magnesio y potasio, buscando mantener el balance osmótico por la reducción de la lactosa en la leche calculada en un 10%.

Por otro lado, como consecuencia de la presencia de enzimas lipolíticas, a medida que aumenta el CCS aparecen sabores rancios debido a la acción de las lipasas sobre las grasas de la leche, deteriorándolas y liberando ácidos grasos de bajo peso molecular que producen sabores desagradables. (6)

CONCLUSIONES.

De acuerdo con los resultados obtenidos por las pruebas, se estableció que la diferencia al evaluar calidades de leche mediante los dos métodos es bastante notoria. Se debe tomar en cuenta que un CCS evalúa de manera indirecta la totalidad de bacterias presentes en la leche, tanto aerobias como anaerobias, mientras la prueba de resazurina y la de reducción de azul de metileno por mencionarla, tasan únicamente la presencia de bacterias aerobias, debido a que utilizan como principio de reacción la óxido-reducción del oxígeno disuelto presente en la leche y que es consumido por las bacterias para su reproducción. Esto limita y/o desestima la presencia de contaminación procedente de bacterias anaerobias, las cuales son las principales fuentes de infección intramamaria en las ubres de las vacas y que desencadenan la mastitis clínica o sub-clínica dependiendo de la agresividad de las bacterias, tal como lo reporta la literatura. Los gérmenes acidificantes y reductores, mencionados anteriormente, son los más importantes en la prueba de la resazurina, mientras que las células somáticas a consecuencia de la mastitis son las que menos la influyen. (Figura 4)

Por lo tanto, el determinar el estado de la calidad higiénica y sanitaria de la leche por medio de pruebas basa-

das en el potencial de óxido-reducción sin tomar en cuenta la contaminación de bacterias anaerobias, resulta bastante equivocado en casos de leches mastíticas, pues no se está considerando esta última clase de microorganismos y que resultan de alto riesgo para la salud de los consumidores. En caso contrario, leches no mastíticas, es una prueba fácil, rápida y económica para determinar indirectamente la calidad microbiológica de la leche.

REFERENCIAS

- (1) AMIOT, J. Ciencia y Tecnología de la leche. Principios y aplicaciones. Zaragoza (España): Acribia, 1987, p 9.
- (2) FEDERACIÓN NACIONAL DE GANADEROS, FEDEGAN. COTRINO B., Víctor D.M.V. [en línea] Manejo integrado de plagas y enfermedades en explotaciones ganaderas. Mastitis y calidad de la leche. Bogotá. Agosto de 2003. [Citado en 30 de agosto de 2004]. Disponible desde Internet: URL:<http://www.fedegan.org.co81manejointegrado.html>
- (3) COOPERATIVA COLANTA. Revista Despertar Lechero. Células somáticas y calidad de leche. Medellín (Colombia): Colanta, 2000. v. 17, p. 39-48.
- (4) UNIVERSIDAD DE ZULIA. Introducción al control de la calidad de la leche cruda. Guía práctica. [en línea]. Maracaibo. 2003 [citado en 30 de agosto de 2004]. Disponible desde Internet: URL:<http://www.members.tripod.com.ve/tecnología/introducción.html>.
- (5) UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MÉXICO UNAM. III Congreso nacional de control de mastitis y calidad de la leche [en línea] Diagnóstico de la mastitis subclínica bovina. Miguel Ángel Blanco Ochoa. Ciudad de México. 23 de junio de 2003. [Citado en 30 de agosto de 2004]. Disponible desde Internet: URL:<http://www.cnmweb.bizland.com/publicaciones/Blanco.PDF>
- (6) COOPERATIVA COLANTA. Revista Despertar Lechero. Relación del recuento de células somáticas con la proteína en leche de bovinos. Medellín (Colombia): Colanta, 2001. v. 21, p. 10-32.