

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias de la Salud

Evaluación del efecto de bacterias inteligentes como tratamiento alternativo para reducir el conteo de células somáticas en una hacienda lechera de Pichincha, Ecuador: reporte de caso.

Juan Felipe Torres Apolo

Medicina Veterinaria

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Médico Veterinario.

Quito, 04 de mayo de 2025

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias de la Salud

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

Evaluación del efecto de bacterias inteligentes como tratamiento alternativo para reducir el conteo de células somáticas en una hacienda lechera de Pichincha, Ecuador: reporte de caso.

Juan Felipe Torres Apolo

Nombre del profesor, Título académico Rommel Lenin Vinueza, DMVZ, MSc, PhD

Quito, 04 de mayo de 2025

© **DERECHOS DE AUTOR**

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Juan Felipe Torres Apolo.

Código: 00210214

Cédula de identidad: 1724164106

Lugar y fecha: Quito, 04 de mayo de 2025

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETheses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETheses>.

AGRADECIMIENTOS

A mi Dios, toda gloria y todo honor, a él. Me ha enseñado el camino, aunque a veces yo no lo vi.

A mi tutor, el Doctor Ramiro Díaz, por su valiosa ayuda, sus sugerencias e incluso su paciencia, me ha brindado la guía para pulir cada aspecto del presente trabajo.

A la Escuela de Medicina Veterinaria de la USFQ, me ha proporcionado tanto las herramientas como los conocimientos para poder superar los desafíos y salir adelante.

Hay dos momentos muy importantes en la vida de una persona: cuando nace y cuando descubre para qué. Un agradecimiento muy especial a quien me mostró mi vocación desde la primera clase, quien me mostró el camino que quiero seguir, en lo que me quiero convertir. Mi mentor, el Doctor Fernando Salas.

A todos mis profesores, profesionales de gran experiencia y conocimientos que han sido un pilar fundamental para mi formación académica. Iniciando por la decana, la Doctora Gabriela Arroyo, por su apoyo en todo mi proceso estudiantil, en cada oportunidad me brindó una sonrisa y un consejo.

Al Doctor Juan José Noboa, al Doctor Alejandro Gonzáles y al Doctor Daniel Rodas, han compartido su experiencia y conocimientos conmigo acerca de esta área de la medicina veterinaria que tanto amamos, me han brindado una mano cuando lo necesité y me han sabido corregir de igual manera cuando fue necesario.

A Maribel y Luis, por su gran apoyo para la realización de este trabajo.

A la marca Priority, cuyos productos fueron utilizados en este estudio.

DEDICATORIA.

A Shelly, sin ti nada de esto hubiese sucedido. Por ti decidí ser un médico veterinario, en cada noche que pasé haciendo deberes o estudiando, tú estuviste a mi lado. Me impulsaste a siempre dar un paso más, o a no darlo. Gracias por llegar a mi vida un día de diciembre de 2018 en una bolsa de mercado.

A mis padres, José Antonio y Agueda Emperatriz, por ser la representación del amor hacia sus hijos, por el apoyo y el sacrificio para que mi hermana y yo lleguemos a ser grandes seres humanos. Gracias por los grandes momentos a mi lado, y claro, también por los momentos donde se tuvo que hacer correcciones. Gracias por permitirme expandir mis alas y dirigirme hacia mi propio horizonte.

A mi hermana, Tammia Mylene, por su incondicional confianza en mí, por perdonar mis errores y cubrir alguna que otra travesura. Gracias por enseñarme a compartir, a tener paciencia y apego. También, aunque no lo necesitas, gracias por permitirme sentir esa inmensa necesidad de protegerte. Siempre he dicho que eres diez veces mejor que yo, eres más que increíble.

A Jairo y Daniel, mis hermanos, han creído en mí sin dudarlo ni una sola vez, gracias por eso, por creer en mí, incluso cuando yo no creí en mí mismo. Gracias, por los grandes momentos a mi lado, riendo, haciendo locuras, jugando o, incluso, derramando una lágrima.

A mis amigos, Kevin, Doménica y Diana, por cada éxito y cada fracaso, dimos exámenes que parecían imposibles, hicimos trabajos interminables, y disfrutamos cada momento que pasamos juntos. Kevin, sé que serás un excelente Chef, te lo dejo por escrito. Doménica y Diana, de ustedes no me libro, colegas.

RESUMEN

Este estudio observacional y descriptivo evaluó el comportamiento del conteo de células somáticas (CCS) tras la administración oral de bacterias *inteligentes* (*Bacillus subtilis* y *Lactobacillus brevis*) como una alternativa no antibiótica en un hato lechero ubicado en Pichincha, Ecuador, con antecedentes de CCS elevados. Durante un periodo de seis meses, se realizó un seguimiento que incluyó 14 pruebas quincenales de CMT y análisis periódicos de calidad de leche. Si bien se observó una reducción del 11,75% en los valores de CCS del tanque, esta no fue estadísticamente significativa ($p = 0,077$), y los valores se mantuvieron dentro de los rangos comúnmente asociados a la raza Brown Swiss, predominante en el hato evaluado. La incidencia de mastitis subclínica, según las pruebas CMT, varió entre 1,14% y 18,4%.

Los resultados sugieren que, aunque las bacterias inteligentes podrían representar una opción prometedora frente al uso de antibióticos, su eficacia puede estar influenciada por factores fisiológicos como la predisposición racial, así como por las condiciones específicas del sistema productivo. Este reporte de caso resalta la importancia de seguir explorando tratamientos alternativos adaptados a la realidad de cada explotación, reconociendo las limitaciones propias de estudios sin grupo control y con una sola unidad productiva evaluada.

Palabras clave: Células somáticas, Mastitis bovina, Bacterias inteligentes, Probióticos, Salud mamaria, Producción lechera, Terapia alternativa.

ABSTRACT

This observational and descriptive study evaluated the behavior of somatic cell count (SCC) following the oral administration of intelligent bacteria (*Bacillus subtilis* and *Lactobacillus brevis*) as a non-antibiotic alternative in a dairy herd located in Pichincha, Ecuador, with a history of elevated SCC levels. Over a six-month period, the herd was monitored through 14 biweekly CMT tests and regular milk quality analyses. Although an 11.75% reduction in bulk tank SCC was observed, the decrease was not statistically significant ($p = 0.077$), and values remained within ranges typically associated with the Brown Swiss breed, which predominated in the herd. The incidence of subclinical mastitis, based on CMT results, ranged between 1.14% and 18.4%.

These findings suggest that while intelligent bacteria may represent a promising alternative to antibiotics, their effectiveness could be influenced by physiological factors such as breed predisposition and by specific characteristics of the production system. This case report highlights the need to continue exploring innovative treatments for bovine mastitis while recognizing the limitations of studies without a control group and conducted in a single production unit.

Key words: Somatic cell, Bovine mastitis, Smart bacteria, Probiotics, Mammary health, Dairy production, Alternative therapy.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	12
Formulación del problema / pregunta de investigación	18
Objetivo General:	19
Objetivos Específicos:	19
DESARROLLO DEL ESTUDIO.	20
Metodología.....	20
Descripción del caso	21
Análisis de datos	22
Análisis estadístico.	23
Resultados.....	24
Conteo de células somáticas (CCS).....	24
Evaluación de la incidencia de mastitis subclínica mediante CMT	27
Discusión	28
Periodo de lactancia.....	28
Estrés térmico.	28
Altura.	29
Manejo y rutina de ordeño.....	30
Raza del ganado.....	31
Limitaciones.	31
CONCLUSIONES.....	33
REFERENCIAS.....	34
ANEXO A: Tabla de pagos por parámetro de calidad Sanitaria CCS (conteo de células somáticas)	39
ANEXO B: Tabla de interpretación de resultados de la prueba CMT	39
ANEXO C: Datos crudos de conteo de Células somáticas (CCS) por muestra.	40
ANEXO D. Cálculo del coeficiente de variación.	42
ANEXO E. Resultados de la prueba de normalidad (Shapiro-Wilk).....	42
ANEXO F. Prueba estadística aplicada (Mann-Whitney U)	42

ÍNDICE DE TÁBLAS.

Tabla 1: Principales características del diseño del estudio.....	22
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Evolución del conteo de células somáticas en leche cruda antes y durante la suplementación con bacterias inteligentes.....	25
Figura 2: Análisis de boxplot de la Distribución del conteo de células somáticas (CCS) en leche antes y durante el tratamiento con bacterias inteligentes.	26
Figura 3: Incidencia de mastitis subclínica estimada mediante CMT durante la suplementación con bacterias inteligentes.....	27

INTRODUCCIÓN

El conteo de células somáticas (CCS) es una medida cuantitativa que determina el número de células somáticas presentes en cada mililitro de leche. Estas células somáticas son en su mayoría leucocitos (neutrófilos y macrófagos), componentes integrales del sistema inmunológico de la vaca, que se van a movilizar a la ubre como respuesta a inflamación o infección. Si el número de leucocitos aumenta significativamente es clara señal de la respuesta inmune de la ubre a una invasión patógena. Otro componente de las células somáticas son las células epiteliales, pero en mucha menor proporción, dichas células van a desprenderse normalmente del tejido secretor de la ubre (Li et al., 2014).

Con frecuencia el CCS alto es indicativo de mastitis bovina que, se define como la inflamación de glándulas mamarias causada principalmente por infecciones bacterianas, los agentes infecciosos más comunes son *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, y *Staphylococcus aureus*. La mastitis puede manifestarse de forma clínica o subclínica. Si se presenta de forma subclínica, existe una aparente normalidad del animal, pero hay un aumento en el recuento de células somáticas y una disminución en la producción de leche, se puede diagnosticar con pruebas como el CMT (California Mastitis Test) o el conteo de células somáticas. Por otro lado, la mastitis clínica se va a presentar con signos clínicos evidentes como dolor, enrojecimiento e hinchazón de la ubre y ganglios linfáticos, fiebre y también con cambios notables en la leche como la formación de coágulos o escamas. De estas dos formas de presentación, la mastitis subclínica se considera la más costosa y la de mayor prevalencia debido a la dificultad de detección a simple vista y su impacto en la calidad de leche (Pedersen et al., 2021).

La mastitis se asocia a considerables pérdidas económicas y estas se dan desde la disminución de la producción de leche, los costos de tratamiento, el descarte de leche contaminada por alteraciones en la leche o por el uso de antibióticos y el descarte de animales infectados (Gomes et al., 2016). Además de la reducción en la cantidad de leche producida, la mastitis también va a afectar su calidad, aumentando el CCS y provocando cambios en la composición. Un conteo elevado de células somáticas puede disminuir el valor comercial de la leche (Pineda et al., 2024). En Ecuador, el precio del litro de leche se determina en función de su calidad, y un criterio fundamental de pago es la cantidad de células somáticas (CCS) presentes en la leche. Para el pago del litro de leche en función del criterio de células somáticas se toma como referencia un valor base de 250.000 células/ml. Por cada 15.000 células/ml por debajo de este valor, se aplica una bonificación de USD 0,0030, mientras que por cada 15.000 células/ml por encima, se deduce el mismo valor, es decir, USD 0,0030 (Ministerio de Producción, Comercio Exterior, Inversiones y Pesca & Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2024). Entonces, un alto recuento de células somáticas reduce el valor comercial de la leche y, en muchos casos, genera penalizaciones económicas para los productores.

Se estima que la mastitis puede reducir la producción de leche entre un 10% y un 20% por vaca afectada, lo que representa pérdidas económicas significativas para los ganaderos. Además, el descarte de leche contaminada, el costo del tratamiento con antibióticos y la posible eliminación de animales severamente afectados incrementan aún más el impacto económico negativo (Zambrano et al., 2017).

El tratamiento actual para la mastitis es con el uso de antibióticos, sin embargo, el uso excesivo e indiscriminado de estos a lo largo de los años ha desencadenado en una

creciente problemática, las bacterias resistentes a antibióticos. Este desafío latente, no solo en el ámbito ganadero sino de salud pública en general, ha impulsado la búsqueda de tratamientos alternativos para la prevención y control de enfermedades. En este contexto, las bacterias inteligentes se investigan como una posible alternativa a los tratamientos antibióticos tradicionales. El uso de bacterias inteligentes para la prevención y el tratamiento de mastitis ha generado interés tanto en la comunidad científica como en la industria láctea (Kober et al., 2022).

El término “bacterias inteligentes” hace referencia principalmente a cepas específicas de bacterias que son seleccionadas usando métodos de secuenciación genómica de ADN. Son microorganismos vivos que, al administrarse en cantidades adecuadas, van a conferir un beneficio para la salud de humanos y animales mejorando la microbiota intestinal (Urakawa et al., 2022). Las bacterias inteligentes son cepas de microorganismos seleccionadas por ingeniería metabólica o modificadas genéticamente para cumplir funciones específicas que van más allá de las capacidades naturales de bacterias convencionales, un ejemplo de esto es que las bacterias inteligentes responden a estímulos específicos, como lo son las variaciones de pH o presencia de determinados patógenos, o modulan respuestas inmunitarias de forma dirigida. Mientras que otras bacterias o probióticos actúan de forma más general y producen sustancias de forma constante (Elf, 2016).

Existen algunas bacterias que ya son ampliamente usados como probióticos, como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, pero su aplicación ha sido mayormente en humanos y ratones (Suez et al., 2019). En ganadería todavía es necesario realizar estudios adicionales para poder confirmar que los animales a los cuales se les suministra estas bacterias pueden

tener efectos sistémicos que contribuyan a la inmunidad mamaria, a la prevención de infecciones y, por consecuencia, a la reducción de células somáticas presentes en leche.

En el presente estudio se utilizarán bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bacillus*. En específico, se emplearán las cepas *Bacillus subtilis* (B5000h, B5005h y B5150h) y *Lactobacillus brevis* (1E-1). La justificación para el uso de estas bacterias se detalla a continuación.

Bacillus subtilis es una bacteria gram positiva aeróbica o anaeróbica facultativa que forma esporas altamente resistentes a las condiciones ácidas del estómago. Tras su administración oral y posterior llegada al intestino, estas esporas germinan, dando lugar a formas vegetativas metabólicamente activas. Durante la germinación y el posterior crecimiento bacteriano, se consume oxígeno, contribuyendo a crear un ambiente más anaeróbico en intestino y, como resultado, hay un crecimiento adecuado de la microbiota intestinal (Suva et al., 2016).

Algunas cepas, como la *B. subtilis* C-3102 se ha usado como un aditivo probiótico para la alimentación de animales de producción desde 1986. El suministro oral de estas bacterias mostró ser benéfico en pollos ya que, disminuyó las proporciones de *Salmonella* y *E. coli* a nivel intestinal y aumentó la frecuencia de *Lactobacillus* beneficiosos (Jeong & Kim, 2014). Esta misma cepa produjo un aumento del consumo de alimento en cerdos, redujo la pérdida de condición corporal en las etapas finales de lactancia y aumentó significativamente el peso al destete de los lechones nacidos de cerdas que fueron suplementadas con estas bacterias (Kritas et al., 2015).

Por otro lado, *Lactobacillus brevis* es una bacteria probiótica usada como un microorganismo que se administra en la dieta directamente, su uso ha sido probado en

lechones vía suplementación láctica previo al destete. Se demostró que existe una mejora del sistema inmune y también una reducción del establecimiento de patógenos al colonizar tempranamente el tracto gastrointestinal con la cepa 1E1 de *Lactobacillus brevis* (Gebert et al., 2011).

El mecanismo de acción de *Bacillus subtilis* se basa en:

- **Inhibición de la formación de biofilm por parte de *Staphylococcus aureus*:**

Bacillus subtilis produce metabolitos como surfactinas, fengicinas y iturinas, que interfieren con la formación de biopelículas por parte de patógenos como *Staphylococcus aureus*. Estas sustancias alteran la adherencia celular y la comunicación bacteriana (quorum sensing), impidiendo que *S. aureus* se establezca sobre superficies como el epitelio mamario. Sin biopelícula, el patógeno queda más vulnerable y es más fácil de eliminar por el sistema inmune o competir con otras bacterias (Qiu et al., 2022).

- **Modulación de la respuesta inmune:** *Bacillus subtilis* estimula el sistema inmunológico del hospedero al interactuar con células inmunitarias del intestino y la mucosa, promoviendo la producción de citoquinas antiinflamatorias y aumentando la actividad de macrófagos y neutrófilos. A través de esta modulación, *B. subtilis* ayuda a fortalecer la respuesta defensiva frente a infecciones, sin provocar inflamación excesiva (Urakawa et al., 2022).

- **Producción de sustancias antimicrobianas:** *Bacillus subtilis* produce péptidos antimicrobianos (bacteriocinas) y compuestos como ácidos grasos de cadena corta, los cuales tienen actividad directa contra bacterias patógenas. Estas sustancias pueden dañar la membrana celular de los patógenos, interferir con su metabolismo o inhibir

su crecimiento. Esta acción ayuda a reducir la carga bacteriana en la glándula mamaria y a restablecer el equilibrio de la microbiota local (Raheel et al., 2023).

Por otro lado, el mecanismo de acción de *Lactobacillus brevis* se basa en:

- **Producción de sustancias antimicrobianas:** *Lactobacillus brevis* secreta compuestos con actividad antimicrobiana, como ácido láctico, ácido acético, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas. Estos compuestos reducen el pH local, creando un ambiente hostil para bacterias patógenas como *Staphylococcus aureus* o *Escherichia coli*. Además, las bacteriocinas actúan de manera específica sobre patógenos, dañando su membrana celular y limitando su crecimiento (Serna et al., 2011).
- **Competencia con patógenos:** *Lactobacillus brevis* compite activamente por los sitios de adhesión en la mucosa mamaria o intestinal, impidiendo que los patógenos se fijen y colonicen. Al ocupar esos nichos ecológicos, *L. brevis* reduce la posibilidad de que microorganismos perjudiciales se establezcan y causen infección. Además, compite por nutrientes esenciales, lo que limita aún más el desarrollo de bacterias indeseadas (Bouchard et al., 2015).
- **Formación de biofilm beneficioso:** *Lactobacillus brevis* puede formar biopelículas protectoras sobre las superficies epiteliales. A diferencia de las biopelículas patógenas, estas estructuras benefician al hospedero al actuar como una barrera física frente a la colonización de patógenos, estabilizar la microbiota local y mantener la homeostasis del ambiente. Esta biopelícula también favorece la permanencia prolongada de la bacteria probiótica en el sitio de acción. (Wallis et al., 2018).

Formulación del problema / pregunta de investigación:

En el sistema lechero donde se llevó a cabo este estudio, se ha evidenciado de forma persistente un CCS elevado en los análisis de leche, lo que ha generado preocupación respecto a la salud mamaria del hato y la calidad del producto final. Aunque, no ha sido constante la presencia de mastitis subclínica o clínica, cuando ha habido casos se han implementado tratamientos convencionales utilizando antibióticos como penicilina G/dihidroestreptomicina, ceftiofur o tilosina y, en un caso severo, espiramicina, sin embargo, los niveles de CCS no han mostrado una reducción sostenida.

Algunos animales fueron considerados “vacas problema”, vacas que, pese a haber recibido uno o más tratamientos para el control de la mastitis, continúan presentando signos persistentes de la enfermedad, ya sea en forma clínica o subclínica, evidenciada principalmente por resultados positivos y recurrentes en pruebas de CMT. Se ha observado que los cuatro cuartos mamarios de estas vacas presentaban resultados de CMT grado 3 (+++), motivo por el cual se realizaron cultivos bacteriológicos y antibiogramas. Estos no evidenciaron resistencias significativas a los antimicrobianos aplicados, lo que llevó a considerar otras posibles causas subyacentes, como deficiencias en el manejo o factores inmunológicos.

Como parte del abordaje integral, se revisó y ajustó la rutina de ordeño. Se cambiaron mangueras y pezoneras, y se instalaron retiradores automáticos con el objetivo de evitar el sobreordeño, identificado como un posible factor predisponente a lesiones mamarias y elevación del CCS.

Dado que la problemática persistía a pesar de estas medidas, y en búsqueda de reducir el uso de antibióticos, se optó por implementar un tratamiento alternativo basado en la

administración de bacterias inteligentes, compuestas por cepas de *Bacillus subtilis* (B5000h, B5005h, B5150h) y *Lactobacillus brevis* (1E-1). Esta estrategia buscó modular la microbiota intestinal y fortalecer la respuesta inmune del animal, con el propósito de reducir el conteo de células somáticas en leche. Ante esta alternativa al uso de antibióticos, surge la siguiente pregunta:

¿La suplementación con bacterias inteligentes puede contribuir a la reducción del conteo de células somáticas en un hato lechero con historial de valores elevados?

Objetivo General:

Evaluar el efecto de la suplementación con bacterias inteligentes sobre el conteo de células somáticas en un hato lechero de la provincia de Pichincha, Ecuador.

Objetivos Específicos:

1. Documentar la evolución del conteo de células somáticas (CCS) antes y durante la administración de bacterias inteligentes.
2. Monitorear la incidencia de mastitis subclínica a través del California Mastitis Test (CMT) durante el periodo de tratamiento.
3. Analizar la relación entre la suplementación con bacterias inteligentes y los cambios observados en los parámetros de salud mamaria del hato.

DESARROLLO DEL ESTUDIO.

Metodología

El presente trabajo corresponde a un reporte de caso documentado en una hacienda ubicada en una zona andina del norte de Ecuador, aproximadamente a 3500 metros sobre el nivel del mar. Presenta un clima templado con temperatura media anual de 12-16°C y precipitaciones de 800-1,200 mm anuales, concentradas principalmente entre octubre y mayo. Dicha hacienda presentaba valores persistentemente elevados de células somáticas (CCS) en leche, sin signos clínicos evidentes de mastitis. La intervención consistió en la suplementación oral con bacterias inteligentes como alternativa para mejorar la salud mamaria y reducir la carga celular en la leche.

Para el monitoreo se tomaron muestras y se analizaron mediante citometría de flujo en el laboratorio de recepción y calificación de leche cruda de Pasteurizadora Quito, utilizando el equipo automatizado SomaCount. El procedimiento consistió en teñir el ADN celular con un reactivo fluorescente y detectar la fluorescencia emitida por cada célula tras ser impactada por un láser, permitiendo un conteo electrónico preciso por mililitro.

Además, se aplicó el California Mastitis Test (CMT), una prueba cualitativa que permitió detectar alteraciones en la viscosidad de la leche, clasificada mediante una escala visual de 0 a 3. Los resultados fueron registrados y se consideró la presencia de mastitis subclínica en aquellos cuartos con puntaje ≥ 2 .

Descripción del caso

El hato intervenido pertenece a una hacienda lechera de mediana escala, con una rutina de ordeño dos veces al día y registros históricos de CCS elevados. Se evaluó un promedio de 44 vacas en producción mediante un enfoque observacional y descriptivo. A lo largo de 12 meses se realizaron análisis de células somáticas (CCS) con una frecuencia de muestreo cada 5 días, en total se realizaron 73 análisis. Paralelamente, durante un periodo de 6 meses se realizaron pruebas de CMT con una frecuencia quincenal, en total se realizaron 14 pruebas.

A partir del 16 de septiembre de 2024, se inició la administración de bacterias inteligentes durante seis meses consecutivos. El suplemento consistió en una mezcla de *Bacillus subtilis* (cepas B5000h, B5005h, B5150h) y *Lactobacillus brevis* (1E-1), administrado por vía oral una vez al día, durante la suplementación del segundo ordeño. Las dosis fueron ajustadas según el resultado del CMT, aplicando una dosis doble por siete días en los casos de mastitis subclínica ($\text{CMT} \geq 2$).

Característica	Descripción
Tipo de estudio	Observacional, descriptivo, tipo reporte de caso
Número de animales evaluados	Promedio de 44 vacas en producción
Grupo evaluado	Un solo grupo (sin grupo control)
Frecuencia de muestreo CCS	Cada 5 días
Número total de análisis CCS	73 análisis de células somáticas (CCS)
Duración del estudio CCS	12 meses (febrero 2024 – marzo 2025)
Muestras pretratamiento	39 muestras
Muestras durante el tratamiento	34 muestras
Evaluaciones CMT realizadas	14 pruebas
Frecuencia de CMT	Cada 15 días
Duración del estudio CMT	6 meses (16 de septiembre 2024 – marzo 2025)
Variables evaluadas	Cantidad de células somáticas, presencia de mastitis subclínica.
Método de tratamiento	Administración oral de bacterias inteligentes diariamente durante suplementación del segundo ordeño.
Dosis aplicada	10 g/vaca/día; doble dosis por 7 días en casos con $CMT \geq 2$

Tabla 1: Principales características del diseño del estudio.

Análisis de datos

Los datos obtenidos fueron organizados y sistematizados en una hoja de cálculo para su análisis. Se evaluó un total de 73 muestras de leche recolectadas durante 12 meses, correspondientes a análisis de conteo de células somáticas (CCS), de las cuales 39 pertenecen al periodo previo al tratamiento y 34 al periodo durante la suplementación con bacterias inteligentes. Los valores de CCS fueron graficados para observar su tendencia temporal.

Adicionalmente, se realizaron 14 pruebas de CMT (California Mastitis Test) durante seis meses, con una frecuencia quincenal, para monitorear la incidencia de mastitis subclínica

a nivel de cuarto mamario. Los resultados del CMT también fueron graficados para evidenciar su evolución a lo largo del tiempo.

Análisis estadístico.

El análisis estadístico fue realizado en el software Jamovi v2.4.2, el cual se utilizó para organizar los datos, aplicar pruebas de normalidad y realizar el análisis comparativo entre grupos.

Los datos de conteo de células somáticas (CCS) fueron obtenidos a partir de muestras del tanque de leche tomadas cada cinco días durante un periodo de 12 meses. Estas se agruparon en dos periodos según el momento de aplicación del tratamiento: pretratamiento ($n = 39$) y tratamiento ($n = 34$). Los datos fueron considerados como muestras independientes, ya que no se contó con información individualizada por vaca que permitiera emparejar los resultados a lo largo del tiempo.

Para determinar si los datos presentaban una distribución normal, se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk. Además, se calculó el coeficiente de variación (CV) de cada grupo para evaluar la dispersión relativa de los datos.

En base al resultado de la prueba de normalidad, se seleccionó la prueba estadística más adecuada. Dado que uno de los grupos no presentó distribución normal, se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney U para comparar los valores de CCS entre los grupos, con un nivel de confianza del 95% ($\alpha = 0,05$). Además, se elaboró un diagrama de caja (boxplot) para visualizar la dispersión y la distribución de los datos en ambos periodos, como complemento del análisis estadístico.

Resultados

Durante el periodo de evaluación, se realizó un seguimiento sistemático del hato con base en los análisis de conteo de células somáticas (CCS) y la aplicación del California Mastitis Test (CMT). Ambos parámetros fueron monitoreados para observar la evolución de la salud mamaria antes y durante la suplementación con bacterias inteligentes.

Conteo de células somáticas (CCS)

Se registraron 73 análisis de CCS a lo largo de los doce meses del estudio, con una frecuencia de muestreo cada cinco días. En el periodo previo al tratamiento, el promedio general fue de 498.538 células/ml. Tras el inicio de la suplementación, los valores mostraron una tendencia descendente gradual. Al finalizar el tratamiento, el promedio general fue de 439.971 células/ml, lo que representa una disminución del 11,75% con respecto al valor inicial.

En el análisis estadístico, La prueba de Shapiro-Wilk mostró que el grupo pretratamiento no presentó distribución normal ($p < 0,001$), mientras que el grupo tratamiento sí lo hizo ($p = 0,117$).

El coeficiente de variación fue del 27,5% en el grupo pretratamiento y del 18,3% en el grupo tratamiento, lo que indica una menor dispersión de los valores tras la intervención.

La prueba de Mann-Whitney U dio un estadístico $U = 503$ con un valor de $p = 0,077$, por lo que no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los conteos de células somáticas antes y postratamiento ($p > 0,05$).

El análisis del boxplot (figura 2) mostró una disminución en la mediana del conteo de células somáticas (CCS) durante el tratamiento con bacterias inteligentes, alineándose con

la reducción global del 11.75% observada. Sin embargo, esta diferencia no resultó estadísticamente significativa ($p = 0.077$, prueba de Mann-Whitney U). La dispersión de los datos, medida mediante el coeficiente de variación (CV), fue mayor en el periodo pretratamiento (CV = 27.5%) que durante la intervención (CV = 18.3%). Además, se identificaron valores atípicos en el grupo pretratamiento, los cuales estuvieron ausentes en el grupo de tratamiento. El solapamiento de los rangos intercuartiles entre ambos grupos sugiere que, aunque hubo una tendencia a la reducción del CCS, esta no fue concluyente desde el punto de vista estadístico.

La evolución de los datos se presenta en la Figura No. 1, donde se marca la fecha de inicio del tratamiento (16 de septiembre de 2024) como referencia temporal.

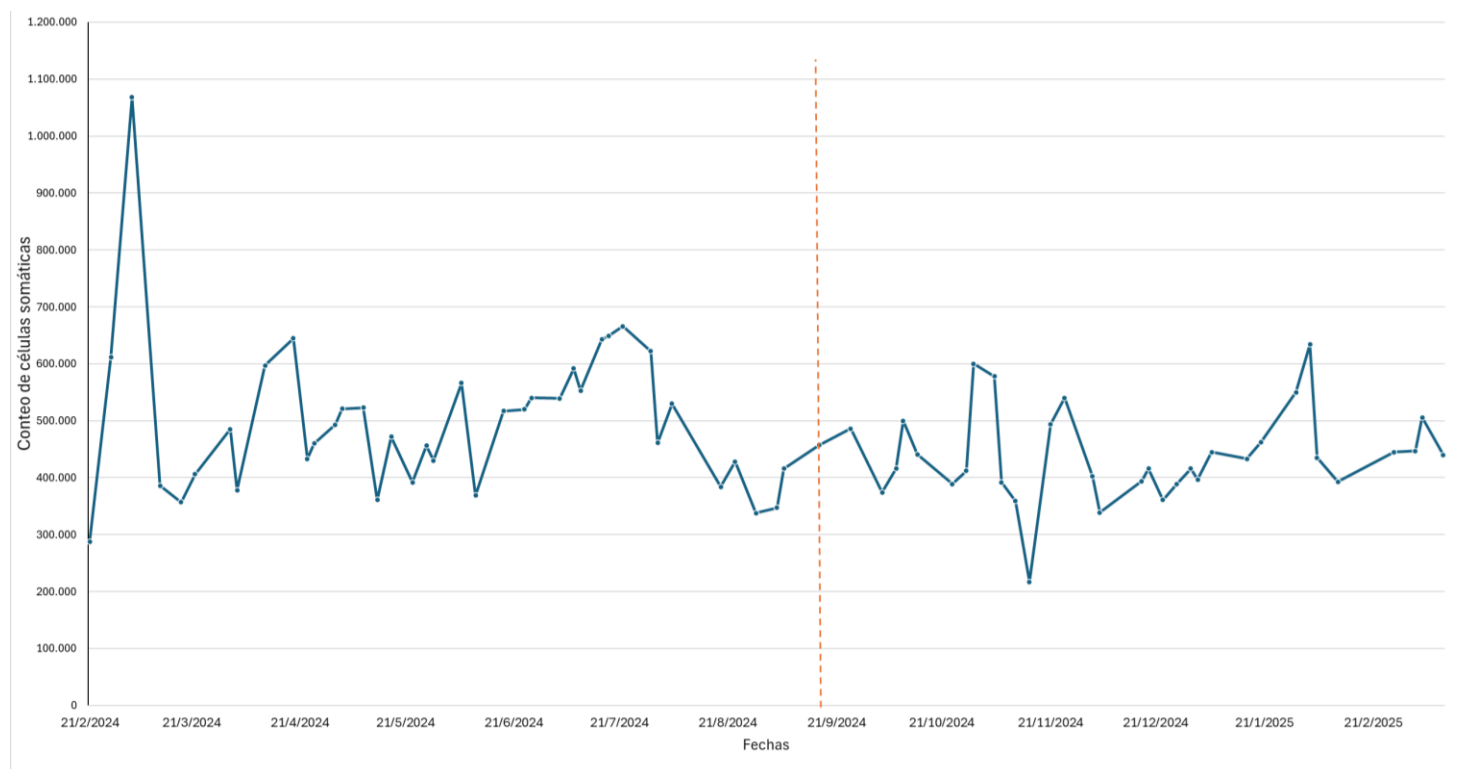


Figura 1: Evolución del conteo de células somáticas en leche cruda antes y durante la suplementación con bacterias inteligentes.

Nota: Se muestra la variación del conteo de células somáticas (CCS) en el hato lechero durante un periodo de doce meses. Los análisis se realizaron cada cinco días, incluyendo seis meses previos y seis meses durante la aplicación del tratamiento con bacterias inteligentes. La línea discontinua indica la fecha de inicio del tratamiento (16 de septiembre de 2024). Se observa una tendencia general a la disminución del CCS tras la intervención.

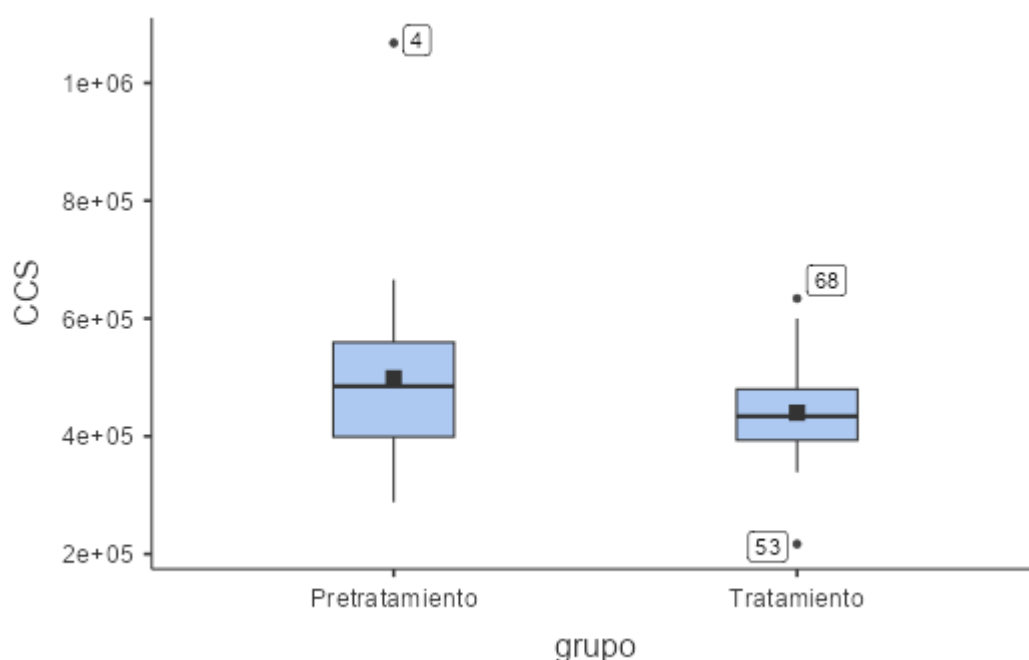


Figura 2: Análisis de boxplot de la Distribución del conteo de células somáticas (CCS) en leche antes y durante el tratamiento con bacterias inteligentes.

Nota: Boxplot comparativo del CCS (células/mL) en el periodo pretratamiento (n=39) y durante el tratamiento con bacterias inteligentes (n=34). La línea central en cada caja representa la mediana, los bordes los percentiles 25-75 (rango intercuartílico), y los bigotes el rango no atípico. Los puntos individuales indican valores atípicos. La prueba de Mann-Whitney U no mostró diferencia significativa entre grupos (p=0.077).

Evaluación de la incidencia de mastitis subclínica mediante CMT

El monitoreo quincenal mediante el CMT permitió estimar la presencia de mastitis subclínica a nivel de cuarto mamario. Al inicio del tratamiento se registraron resultados variables, alcanzando su punto más alto en diciembre de 2024, con un 18,4% de cuartos afectados. A partir de enero de 2025, se evidenció una tendencia sostenida a la disminución, con un descenso progresivo en cada evaluación quincenal. El valor más bajo se obtuvo en marzo de 2025, con una incidencia del 1,14%.

La Figura No. 3 muestra la evolución de esta incidencia a lo largo del periodo de suplementación, destacando la estabilización progresiva del hato hacia niveles compatibles con una mejor salud mamaria general.

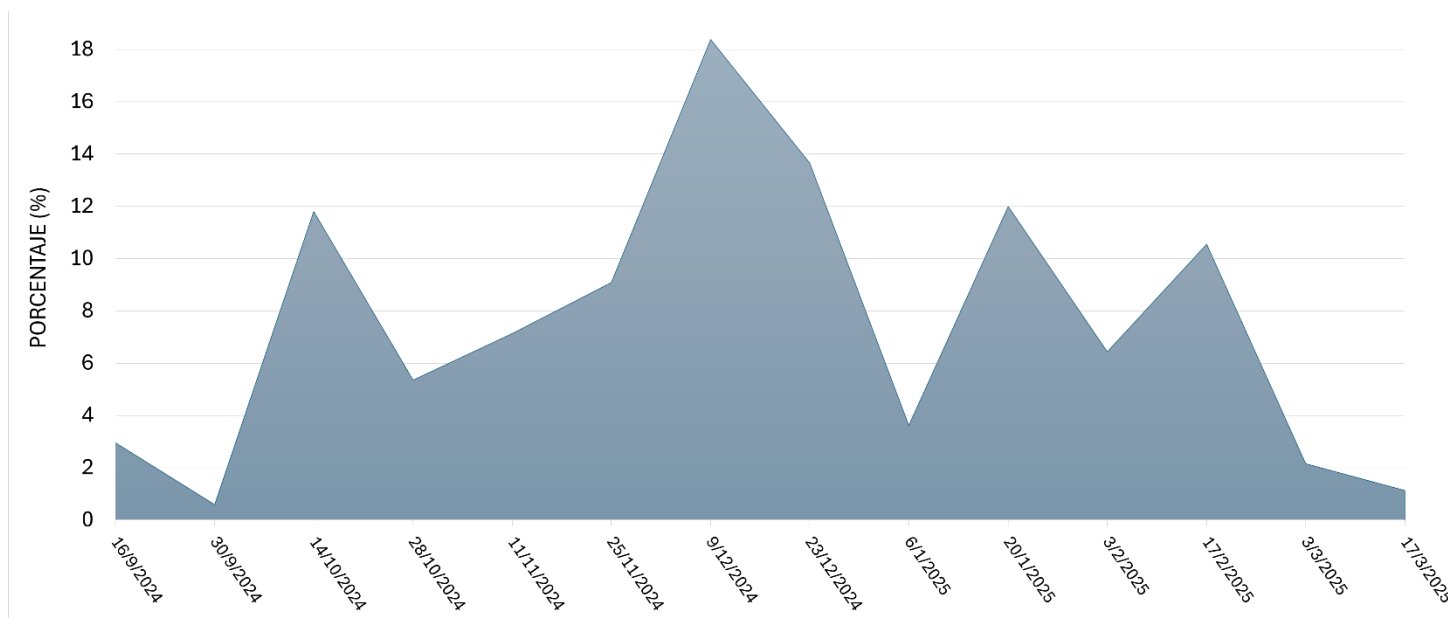


Figura 3: Incidencia de mastitis subclínica estimada mediante CMT durante la suplementación con bacterias inteligentes.

Nota: Se presenta la evolución quincenal de la incidencia de mastitis subclínica en un hato lechero, evaluada mediante el California Mastitis Test (CMT). Se consideraron positivos

los cuartos mamarios con puntajes $CMT \geq 2$. El monitoreo se extendió desde septiembre de 2024 hasta marzo de 2025. La línea indica una reducción progresiva en la proporción de cuartos afectados a lo largo del tratamiento.

Discusión

A pesar de que el tratamiento con bacterias inteligentes (*Bacillus subtilis* y *Lactobacillus brevis*) mostró una reducción en el CCS y en la incidencia de mastitis subclínica, dicha reducción en el CCS no fue estadísticamente significativa. El porqué de esta situación es posible atribuirla a varios factores que pudieron influir en la salud mamaria y también en la respuesta al tratamiento en este sistema de producción lechera.

Periodo de lactancia.

Dado que se trató de mantener una producción estable entre 1200 y 1500 litros cada dos días, el hato se organizó con un 80% de vacas en ordeño y un 20% en el periodo seco. Esto implicó que, durante el desarrollo del estudio, se ordeñaron animales en diferentes etapas de gestación y lactancia, manteniendo un promedio de 44 vacas en ordeño diario. Es conocido que el CCS tiende a aumentar de manera natural conforme la lactancia avanza hacia el periodo seco. (Rice & Bodman, 1993). Las vacas de primer parto van a producir menor cantidad de leche y tienen un conteo de células somáticas más bajo comparadas con vacas multíparas. En adición la inmunidad de la glándula mamaria de las vacas de primer parto es muy superior. A partir del cuarto parto el conteo de células somáticas aumenta significativamente y son más propensas a una infección de las ubres (Gonçalves et al., 2018).

Estrés térmico.

Otro factor relevante que pudo haber influido en la salud mamaria y en los niveles de células somáticas fue el estrés térmico, tanto por altas como por bajas temperaturas. Está

documentado que el estrés térmico afecta directamente al sistema inmunológico del bovino, provocando un incremento en el conteo de células somáticas (CCS) como respuesta a la inmunosupresión. La hacienda donde se realizó este estudio se encuentra a 3500 msnm aproximadamente, una altitud en la que las condiciones climáticas pueden ser particularmente desafiantes. Durante el periodo de evaluación se registraron jornadas de frío intenso, lluvia y viento, así como días de radiación solar directa y temperaturas elevadas, generando un ambiente estresante para los animales.

Las vacas lecheras se consideran en zona de confort térmico cuando la temperatura ambiental se encuentra entre los 5 °C y 25 °C. Por debajo o por encima de ese rango, los animales comienzan a experimentar estrés por frío o calor, respectivamente, lo cual afecta su eficiencia inmunológica y productiva. Estas temperaturas extremas no solo comprometen el bienestar del animal, sino que además influyen negativamente en el volumen de alimento consumido. La alta humedad en ciertas temporadas, junto con deficiencias de micronutrientes debidas a la baja calidad del forraje, directamente afectado por las condiciones climáticas, pueden favorecer el crecimiento de bacterias infecciosas y disminuir aún más la respuesta inmunitaria de las vacas (Alhussien & Dang, 2018).

Altura.

Si bien existen estudios que han señalado una posible relación entre la altitud y el conteo de células somáticas (CCS), observándose valores más elevados en explotaciones ubicadas por encima de los 1200 msnm, esta diferencia se ha asociado principalmente a adaptaciones fisiológicas al entorno, como el aumento en la concentración de eritrocitos y cambios metabólicos que podrían influir indirectamente en la salud mamaria (Alrhoun et al., 2024). En este estudio, el hato evaluado se encuentra a 3500 msnm, bajo condiciones climáticas desafiantes como bajas temperaturas, alta humedad y exposición solar intensa. Sin

embargo, no se puede afirmar que la altitud haya sido un factor determinante en los resultados obtenidos, ya que no fue controlada ni evaluada directamente dentro del diseño metodológico. Se sugiere considerar este tipo de variables ambientales con mayor profundidad en futuros estudios que busquen explorar la eficacia de tratamientos alternativos en diferentes contextos geográficos.

Manejo y rutina de ordeño.

Las prácticas deficientes de manejo general y una rutina de ordeño inadecuada son factores ampliamente asociados al incremento del conteo de células somáticas (CCS) en leche. Incluso en ausencia de infecciones establecidas, un manejo deficiente puede elevar significativamente el riesgo de infecciones intramamarias debido al estrés, la exposición a patógenos y la baja estimulación inmunológica adecuada (Alhussien & Dang, 2018). Sin embargo, en el presente estudio se considera poco probable que estas condiciones hayan sido un factor determinante. La hacienda cuenta con protocolos estrictos de manejo, dirigidos por su propietario, un veterinario especializado en producción animal, quien ha capacitado a su personal para asegurar el buen manejo de los animales.

Durante el periodo de investigación, se verificó que no existen malas prácticas de ordeño; se realiza una adecuada limpieza de ubres antes del ordeño, se evita el sobreordeño mediante el uso de retiradores automáticos, y se lleva a cabo un correcto mantenimiento del sistema de ordeño. Además, los caminos por los que transitan las vacas están adoquinados, lo cual reduce el riesgo de cojeras, minimiza el estrés físico y contribuye a mantener la limpieza de las ubres, disminuyendo así el riesgo de contaminación ambiental y, por ende, de infecciones mamarias.

Raza del ganado.

La raza del ganado es un factor relevante en la variabilidad del conteo de células somáticas (CCS) en leche. (Sharma et al., 2011) menciona que las vacas de razas especializadas en alta producción lechera, como Holstein negra y Brown Swiss, presentan niveles naturalmente más elevados de células somáticas por mililitro en comparación con otras razas ((310.360 células/ml y 423.310 células/ml respectivamente). Esta característica debe considerarse al evaluar la salud mamaria y la respuesta inmunológica frente a infecciones intramamarias.

En el caso específico de la hacienda donde se desarrolló el presente estudio, este factor adquiere especial relevancia. Durante los últimos años se ha implementado un proceso de selección genética orientado a la pureza racial, con el objetivo de conformar un hato exclusivamente de vacas Brown Swiss adaptadas a las condiciones de altura propias de la zona. Si bien actualmente aún existen ejemplares de tipo Holstein y Jersey en menor proporción, la tendencia es avanzar hacia una uniformidad genética basada en la raza Brown Swiss, tanto por razones productivas como comerciales, ya que ello permitiría la comercialización de genética especializada.

Limitaciones.

La principal limitación de este estudio es que no se realizó un emparejamiento entre los animales evaluados antes y durante el tratamiento, lo cual impidió medir con precisión el efecto real de la administración de bacterias inteligentes sobre el conteo de células somáticas (CCS). Al no contar con seguimiento individual, los datos debieron ser analizados como

muestras independientes, lo que reduce la sensibilidad estadística y aumenta el riesgo de que otros factores no controlados influyan en los resultados.

A pesar de la aplicación del tratamiento durante seis meses, la reducción del CCS no fue estadísticamente significativa, lo que podría estar relacionado no solo con el diseño del estudio, sino también con factores fisiológicos y ambientales propios del hato. Uno de ellos es la composición racial, ya que el rebaño estuvo conformado mayoritariamente por vacas Brown Swiss, una raza que presenta niveles naturalmente más elevados de CCS (Koç & Kizilkaya, 2009). Al finalizar el estudio, los valores de CCS se mantuvieron dentro de los rangos esperados para esta raza, lo que sugiere una posible respuesta limitada al tratamiento debido a características fisiológicas propias del animal.

Asimismo, el estado fisiológico de las vacas, especialmente la etapa de lactancia y la condición de multíparas, podría haber influido en la variabilidad inmunológica observada. Este efecto puede verse potenciado por el estrés ambiental derivado de las condiciones de altura (3500 msnm), como frío intenso, radiación solar elevada, humedad variable y fuertes lluvias, que afectan la función inmune y predisponen a trastornos mamarios.

Este estudio presenta otras limitaciones metodológicas importantes. Se trató de un diseño de caso único, realizado en un solo hato lechero, lo que limita la posibilidad de extrapolar los hallazgos a otras explotaciones. Además, no se contó con un grupo control, lo que impide establecer comparaciones directas entre animales tratados y no tratados. Tampoco se realizó un análisis de la microbiota mamaria o intestinal, lo que habría permitido evaluar con mayor profundidad los efectos biológicos del tratamiento.

Finalmente, una de dificultades que se enfrentó fue la falta de estudios previos sobre el uso específico de estas cepas probióticas en condiciones similares a las de este estudio, lo que obligó a consultar literatura de contextos muy distintos y adaptarla críticamente.

En este contexto, los resultados obtenidos no deben interpretarse necesariamente como un fracaso terapéutico, sino más bien como una manifestación de las condiciones fisiológicas, productivas y ambientales particulares del sistema evaluado, en las que el CCS elevado puede reflejar una adaptación estructural más que una infección activa no controlada.

Para futuros estudios, se recomienda implementar un diseño experimental más robusto, que incluya al menos un grupo control, seguimiento individualizado por vaca, y análisis complementarios que ayuden a comprender el impacto del tratamiento desde una perspectiva integral. Asimismo, trabajar con una muestra mayor, homogénea y bajo condiciones más controladas permitirá reducir la variabilidad y aumentar el poder estadístico del análisis.

CONCLUSIONES.

Este trabajo aporta evidencia sobre el uso de bacterias inteligentes como alternativa al tratamiento convencional de la mastitis bovina subclínica, en un contexto de producción lechera de altura en el Ecuador. La investigación refuerza la importancia de considerar no solo la presencia de patógenos, sino también los factores fisiológicos, ambientales y raciales que inciden directamente sobre el conteo de células somáticas (CCS) en leche. El hallazgo más relevante fue que, a pesar de una reducción leve en el CCS, los niveles se mantuvieron dentro del rango fisiológico propio de la raza Brown Swiss, lo que sugiere un límite biológico más allá del alcance del tratamiento.

A nivel nacional, este estudio contribuye al conocimiento local sobre el comportamiento de vacas de raza Brown Swiss bajo condiciones climáticas y topográficas particulares de las regiones montañosas de la sierra ecuatoriana, lo cual es de gran valor para veterinarios, ganaderos y futuros proyectos de mejoramiento genético. Internacionalmente,

se han explorado diversos tratamientos para mastitis, incluyendo antibióticos y probióticos, pero pocos estudios integran variables como la altitud extrema o el estrés fisiológico adaptativo como los aquí considerados. A diferencia de otros enfoques que atribuyen el CCS elevado exclusivamente a infecciones, este estudio evidencia que el CCS también puede responder a la genética y a condiciones ambientales complejas.

Personalmente, este trabajo me ha permitido comprender los diferentes enfoques que pueden existir en el manejo de la mastitis y reducción de células somáticas, más allá de los tratamientos farmacológicos. He aprendido a darle valor a la interacción entre genética, ambiente, fisiología animal y prácticas ganaderas. Me ha hecho reflexionar sobre la importancia de buscar soluciones integrales, sostenibles y adaptadas a cada realidad productiva.

REFERENCIAS.

- Alhussien, M. N., & Dang, A. K. (2018). Milk somatic cells, factors influencing their release, future prospects, and practical utility in dairy animals: An overview. *Veterinary World*, 11(5), 562-577. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.562-577>
- Alrhoun, M., Zanon, T., Katzenberger, K., Holighaus, L., & Gauly, M. (2024). Exploring the heights: Impact of altitude on dairy milk composition. *JDS Communications*, 5(2), 139-143. <https://doi.org/10.3168/jdsc.2023-0448>
- Bouchard, D. S., Seridan, B., Saraoui, T., Rault, L., Germon, P., Gonzalez-Moreno, C., Nader-Macias, F. M. E., Baud, D., François, P., Chuat, V., Chain, F., Langella, P., Nicoli, J., Le Loir, Y., & Even, S. (2015). Lactic Acid Bacteria Isolated from Bovine

- Mammary Microbiota: Potential Allies against Bovine Mastitis. *PLoS ONE*, 10(12), e0144831. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144831>
- Elf, J. (2016). Hypothesis: Homologous Recombination Depends on Parallel Search. *Cell Systems*, 3(4), 325-327. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2016.10.005>
- Gebert, S., Davis, E., Rehberger, T., & Maxwell, C. (2011). *Lactobacillus brevis* strain 1E1 administered to piglets through milk supplementation prior to weaning maintains intestinal integrity after the weaning event. *Beneficial Microbes*, 2(1), 35-45. <https://doi.org/10.3920/BM2010.0043>
- Gomes, F., Saavedra, M. J., & Henriques, M. (2016). Bovine mastitis disease/pathogenicity: Evidence of the potential role of microbial biofilms. *Pathogens and Disease*, 74(3), ftw006. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw006>
- Gonçalves, J. L., Cue, R. I., Botaro, B. G., Horst, J. A., Valloto, A. A., & Santos, M. V. (2018). Milk losses associated with somatic cell counts by parity and stage of lactation. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 4357-4366. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13286>
- Jeong, J. S., & Kim, I. H. (2014). Effect of *Bacillus subtilis* C-3102 spores as a probiotic feed supplement on growth performance, noxious gas emission, and intestinal microflora in broilers. *Poultry Science*, 93(12), 3097-3103. <https://doi.org/10.3382/ps.2014-04086>
- Kober, A. K. M. H., Saha, S., Islam, M. A., Rajoka, M. S. R., Fukuyama, K., Aso, H., Villena, J., & Kitazawa, H. (2022). Immunomodulatory Effects of Probiotics: A Novel Preventive Approach for the Control of Bovine Mastitis. *Microorganisms*, 10(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112255>

- Koç, A., & Kizilkaya, K. (2009). Some factors influencing milk somatic cell count of Holstein Friesian and Brown Swiss cows under the Mediterranean climatic conditions. *Archives Animal Breeding*, 52(2), 124-133. <https://doi.org/10.5194/aab-52-124-2009>
- Kritas, S. K., Marubashi, T., Filioussis, G., Petridou, E., Christodouloupoloulos, G., Burriel, A. R., Tzivara, A., Theodoridis, A., & Pískoriková, M. (2015). Reproductive performance of sows was improved by administration of a sporing bacillary probiotic (*Bacillus subtilis* C-3102). *Journal of Animal Science*, 93(1), 405-413. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-7651>
- Li, N., Richoux, R., Boutinaud, M., Martin, P., & Gagnaire, V. (2014). Role of somatic cells on dairy processes and products: A review. *Dairy Science & Technology*, 94(6), 517-538. <https://doi.org/10.1007/s13594-014-0176-3>
- Ministerio de Producción, Comercio Exterior, Inversiones y Pesca, & Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2024). *Acuerdo Interministerial Nro. 024*. https://www.agricultura.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2024/05/acuerdo_interministerial_024.pdf
- Pedersen, R. R., Krömker, V., Bjarnsholt, T., Dahl-Pedersen, K., Buhl, R., & Jørgensen, E. (2021). Biofilm Research in Bovine Mastitis. *Frontiers in Veterinary Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.656810>
- Pineda-Burgos, B. C., Catalán Nájera, J. C., Espinosa Rodríguez, M., Sabino López, J. E., & Vázquez Villamar, M. (2024). El impacto económico de la mastitis bovina en México. *Revista Biológico Agropecuaria Tuxpan*, 12(1), 51-60. <https://doi.org/10.47808/revistabioagro.v12i1.539>

- Qiu, M., Feng, L., Zhao, C., Gao, S., Bao, L., Zhao, Y., Fu, Y., & Hu, X. (2022). Commensal *Bacillus subtilis* from cow milk inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and mastitis in mice. *FEMS Microbiology Ecology*, 98(7), fiac065. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiac065>
- Raheel, I., Mohammed, A. N., & Mohamed, A. A. (2023). The Efficacy of Bacteriocins Against Biofilm-Producing Bacteria Causing Bovine Clinical Mastitis in Dairy Farms: A New Strategy. *Current Microbiology*, 80(7), 229. <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03324-x>
- Rice, D. N., & Bodman, G. R. (1993). G93-1151 *The Somatic Cell Count and Milk Quality*.
- Serna C, L., Valencia H, L. J., & Campos G, R. (2011). LACTIC ACID BACTERIA WITH ANTIMICROBIAL ACTIVITY AGAINST PATHOGENIC AGENT CAUSING OF BOVINE MASTITIS. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 9(1), 97-104. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1692-35612011000100012&lng=en&nrm=iso&tlng=en
- Sharma, N., Singh, N. K., & Bhadwal, M. S. (2011). Relationship of Somatic Cell Count and Mastitis: An Overview. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 24(3), 429-438. <https://doi.org/10.5713/ajas.2011.10233>
- Suez, J., Zmora, N., Segal, E., & Elinav, E. (2019). The pros, cons, and many unknowns of probiotics. *Nature Medicine*, 25(5), 716-729. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0439-x>
- Suva, M., Sureja, V., & Kheni, D. (2016). Novel insight on probiotic *Bacillus subtilis*: Mechanism of action and clinical applications. *Journal of Current Research in Scientific Medicine*, 2(2), 65. <https://doi.org/10.4103/2455-3069.198381>

- Urakawa, M., Zhuang, T., Sato, H., Takanashi, S., Yoshimura, K., Endo, Y., Katsura, T., Umino, T., Tanaka, K., Watanabe, H., Kobayashi, H., Takada, N., Kozutsumi, T., Kumagai, H., Asano, T., Sazawa, K., Ashida, N., Zhao, G., Rose, M. T., ... Aso, H. (2022). Prevention of mastitis in multiparous dairy cows with a previous history of mastitis by oral feeding with probiotic. *Animal Science Journal*, 93(1), e13764. <https://doi.org/10.1111/asj.13764>
- Wallis, J. K., Krömker, V., Paduch, J.-H., Wallis, J. K., Krömker, V., & Paduch, J.-H. (2018). Biofilm formation and adhesion to bovine udder epithelium of potentially probiotic lactic acid bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(2), Article microbiol-04-02-209. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.2.209>
- Zambrano, D., Castillo, E., & Simbaña, L. (2017). *La producción de leche en Ecuador y Chimborazo: Nuevas oportunidades e implicaciones ambientales*. 270-289. https://www.researchgate.net/publication/322756060_La_produccion_de_leche_en_Ecuador_y_Chimborazo_nuevas_oportunidades_e_implicaciones_ambientales

ANEXO A: Tabla de pagos por parámetro de calidad Sanitaria CCS (conteo de células somáticas)

		Base		250.000 células/ml						
		Unidad de		15.000 células/ml						
		Precio por unidad de rango		0,0030 USD						
Desde	-	10.001	25.001	40.001	55.001	70.001	85.001	100.001	115.001	130.001
Hasta	10.000	25.000	40.000	55.000	70.000	85.000	100.000	115.000	130.000	145.000
	\$ 0,0480	\$ 0,0450	\$ 0,0420	\$ 0,0390	\$ 0,0360	\$ 0,0330	\$ 0,0300	\$ 0,0270	\$ 0,0240	\$ 0,0210
Desde	145.001	160.001	175.001	190.001	205.001	220.001	235.001	250.001	265.001	280.001
Hasta	160.000	175.000	190.000	205.000	220.000	235.000	250.000	265.000	280.000	295.000
	\$ 0,0180	\$ 0,0150	\$ 0,0120	\$ 0,0090	\$ 0,0060	\$ 0,0030	\$ -	-\$ 0,0030	-\$ 0,0060	-\$ 0,0090
Desde	295.001	310.001	325.001	340.001	355.001	370.001	385.001	400.001	415.001	430.001
Hasta	310.000	325.000	340.000	355.000	370.000	385.000	400.000	415.000	430.000	445.000
	-\$ 0,0120	-\$ 0,0150	-\$ 0,0180	-\$ 0,0210	-\$ 0,0240	-\$ 0,0270	-\$ 0,0300	-\$ 0,0330	-\$ 0,0360	-\$ 0,0390
Desde	445.001	460.001	475.001	490.001	505.001	520.001	535.001	550.001	565.001	580.001
Hasta	460.000	475.000	490.000	505.000	520.000	535.000	550.000	565.000	580.000	595.000
	-\$ 0,0420	-\$ 0,0450	-\$ 0,0480	-\$ 0,0510	-\$ 0,0540	-\$ 0,0570	-\$ 0,0600	-\$ 0,0630	-\$ 0,0660	-\$ 0,0690
Desde	595.001	610.001	625.001	640.001	655.001	670.001	685.001			
Hasta	610.000	625.000	640.000	655.000	670.000	685.000	700.000			
	-\$ 0,0720	-\$ 0,0750	-\$ 0,0780	-\$ 0,0810	-\$ 0,0840	-\$ 0,0870	-\$ 0,0900			

ANEXO B: Tabla de interpretación de resultados de la prueba CMT

Puntaje	Reacción	Interpretación
0 (Negativo)	Líquido sin cambios	Animal sano
1 (+)	Ligera viscosidad	Animal sano / Mastitis subclínica leve
2 (++)	Formación de gel	Mastitis subclínica moderada
3 (+++)	Gel espeso y pegajoso	Mastitis subclínica grave o Mastitis clínica.

ANEXO C: Datos crudos de conteo de Células somáticas (CCS) por muestra.

Nro. de muestra	CCS	Grupo
1	288.000	Pretratamiento
2	612.000	Pretratamiento
3	1.068.000	Pretratamiento
4	386.000	Pretratamiento
5	357.000	Pretratamiento
6	406.000	Pretratamiento
7	485.000	Pretratamiento
8	378.000	Pretratamiento
9	597.000	Pretratamiento
10	645.000	Pretratamiento
11	433.000	Pretratamiento
12	460.000	Pretratamiento
13	493.000	Pretratamiento
14	521.000	Pretratamiento
15	523.000	Pretratamiento
16	361.000	Pretratamiento
17	472.000	Pretratamiento
18	392.000	Pretratamiento
19	456.000	Pretratamiento
20	430.000	Pretratamiento
21	566.000	Pretratamiento
22	369.000	Pretratamiento
23	517.000	Pretratamiento
24	520.000	Pretratamiento
25	540.000	Pretratamiento
26	539.000	Pretratamiento
27	592.000	Pretratamiento
28	553.000	Pretratamiento
29	643.000	Pretratamiento
30	649.000	Pretratamiento
31	666.000	Pretratamiento
32	622.000	Pretratamiento
33	461.000	Pretratamiento
34	530.000	Pretratamiento
35	384.000	Pretratamiento
36	428.000	Pretratamiento
37	338.000	Pretratamiento

38	347.000	Pretratamiento
39	416.000	Pretratamiento
40	457.000	Tratamiento
41	486.000	Tratamiento
42	374.000	Tratamiento
43	416.000	Tratamiento
44	500.000	Tratamiento
45	441.000	Tratamiento
46	389.000	Tratamiento
47	412.000	Tratamiento
48	600.000	Tratamiento
49	578.000	Tratamiento
50	392.000	Tratamiento
51	359.000	Tratamiento
52	217.000	Tratamiento
53	494.000	Tratamiento
54	540.000	Tratamiento
55	402.000	Tratamiento
56	339.000	Tratamiento
57	394.000	Tratamiento
58	416.000	Tratamiento
59	361.000	Tratamiento
60	389.000	Tratamiento
61	416.000	Tratamiento
62	397.000	Tratamiento
63	445.000	Tratamiento
64	433.000	Tratamiento
65	462.000	Tratamiento
66	550.000	Tratamiento
67	634.000	Tratamiento
68	435.000	Tratamiento
69	393.000	Tratamiento
70	445.000	Tratamiento
71	447.000	Tratamiento
72	506.000	Tratamiento
73	440.000	Tratamiento

ANEXO D. Cálculo del coeficiente de variación.

Grupo	Media	Desviación estándar	CV (%)
Pretratamiento	498.538	136.981	27,5 %
Tratamiento	439.971	80.348	18,3 %

$$CV = \left(\frac{\text{Desviación estándar}}{\text{Media}} \right) \times 100$$

ANEXO E. Resultados de la prueba de normalidad (Shapiro-Wilk)

Grupo	W (Shapiro-Wilk)	Valor p	Interpretación
Pretratamiento	0,862	<0,001	No distribución normal
Tratamiento	0,949	0,117	Distribución normal aceptada

ANEXO F. Prueba estadística aplicada (Mann-Whitney U)

Grupo 1	Grupo 2	Estadístico U	Valor p	Nivel de confianza	Interpretación
Pretratamiento	Tratamiento	503	0,077	95%	No hay diferencia estadísticamente significativa