





Revista de la  
Facultad de **Medicina Veterinaria**  
y de **Zootecnia**



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

Artículos de investigación, reportes de caso y revisión

**Volumen 68 n.º 2, mayo-agosto de 2021**

© UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y DE ZOOTECNIA**

Vol. 68 n.º 2, mayo-agosto 2021

ISSN: 0120-2952 (edición impresa)

ISSN: 2357-3813 (edición en línea)

DOI: 10.15446/rfmvz (CrossRef)

<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/remevz/index>

Correo electrónico: [rev\\_fmzbog@unal.edu.co](mailto:rev_fmzbog@unal.edu.co)

Teléfono 3165000 Ext. 15403 y 15331

Bogotá, D. C., Colombia

**DECANA**

Lucía Botero Espinosa

**VICEDECANA**

Gloria Amparo Casas Bedoya

**DIRECTOR DE BIENESTAR**

Harvey Lozano Márquez

**DIRECTOR DEPARTAMENTO DE SALUD ANIMAL**

Hugo Andrés Gutiérrez Trujillo

**DIRECTOR DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL**

Miguel Angel Landines Parra

**DIRECTORA DE PROGRAMA DE POSGRADO**

Ligia Mercedes Jiménez Robayo

**DIRECTOR DE INVESTIGACIÓN**

Jairo Aureliano Jaime Correa

**REPRESENTANTE DE LOS PROFESORES**

Gonzálo Tellez Iregui

**SECRETARIO ACADÉMICO**

Juan Sebastian Mora Cárdenas

**DIRECTOR EDITORIAL**

Sandra Milena Vásquez Mejía

**COMITÉ EDITORIAL**

Benjamin M. Bohrer. Ph. D., The Ohio State University. United States

Aroa Suarez vega. Ph. D., Universidad de Leon. España

Isabel Gómez-Redondo. Ph. D., GlaxoSmithKline. United States

Lizandra Amoroso. Ph. D., Universidade Estadual Paulista. UNESP. Brasil.

Martha Olivera Angel. Ph. D., Universidad de Antioquia. Colombia.

**COMITÉ CIENTÍFICO**

Benjamin M. Bohrer. Ph. D., The Ohio State University. United States.

Alexandra Calle Madrid. Ph. D., Texas Tech University. United States.

Aroa Suarez vega. Ph. D., Universidad de Leon. España.

Francisco Javier Martínez Cordero. Ph.D., Research Center for Food and Development. México.

Hans Henrik Stein. Ph. D., University of Illinois. United States.

Isabel Gómez-Redondo. Ph. D., GlaxoSmithKline. España.

Lizandra Amoroso. Ph. D., Universidade Estadual Paulista. UNESP. Brasil.

Cesar Agustin Corzo Rugeles. Ph. D., University of Minnesota. United States.

Martha Olivera Angel. Ph. D., Universidad de Antioquia. Colombia.

**EDICIÓN**

Sandra Milena Vásquez Mejía

**COORDINACIÓN EDITORIAL**

Luz Mery Grass Bernal

**CORRECCIÓN DE ESTILO**

Hernán Rojas Rodríguez

**MAQUETACIÓN E IMPRESIÓN**

DGP Editores SAS, Bogotá D. C.



THOMSON REUTERS®

Revista integrada en Scielo Citation Index  
de Thomson Reuters Web of Science



<http://lilacs.bvsalud.org/es/>



[www.scielo.org](http://www.scielo.org)



[www.cabdirect.org](http://www.cabdirect.org)



[www.doaj.org](http://www.doaj.org)



[www.latindex.unam.mx/index.html](http://www.latindex.unam.mx/index.html)



(Plataforma Open Acces de Revistas Científicas  
Electrónicas Españolas y Latinoamericanas)

**DERECHOS DE AUTOR Y COPYRIGHT**

Los derechos de publicación de los contenidos de esta revista pertenecen a la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia. Se autoriza la citación y reproducción de los contenidos con fines académicos y científicos, siempre y cuando se indique explícitamente el nombre de la revista, el nombre de los autores, el año, el volumen, el número y las páginas del material fuente, de acuerdo con los estándares de citación de literatura científica vigentes. La reproducción de la totalidad de alguno de los artículos en otros medios de difusión debe contar con la aprobación del editor de la revista. Los contenidos publicados son responsabilidad exclusiva de los autores. Salvo cuando se especifique lo contrario, las imágenes y tablas son propiedad de los autores.

## Contenido

Política editorial \_\_\_\_\_ 91

### Editorial

Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia: cien años aportando a la salud y a la producción animal

*Dra. Lucía Botero Espinosa M. V., M. Sc., Ph. D.* \_\_\_\_\_ 93

## Artículos de investigación

### Salud animal

Prevalence and effect of intramammary infection due to coagulase-negative staphylococcal (CNS) species in somatic cell counts in milk from Holstein dairy cows in Boyacá, Colombia

[Prevalencia y efecto de la infección intramamaria debida a especies de estafilococos coagulasa negativo (ECN) en el conteo de células somáticas en leche de vacas Holstein en Boyacá, Colombia]

*R. J. Andrade-Becerra, L. E. Tarazona-Manrique, J. C. Vargas-Abella* \_\_\_\_\_ 95

Seropositivity for Bovine Viral Diarrhea and Enzootic Bovine Leukemia viruses in Blanco Orejinegro cattle in Colombia and infection associated-factors

[Soropositividade para o vírus da diarreia viral bovina e leucemia bovina enzoótica em bovinos Blanco Orejinegro na Colômbia e fatores associados à infecção]

*A. Saldarriaga-Saldarriaga, M. Londoño-Gil, L. G. González-Herrera, J. C. Rincón-Flórez, A. López-Herrera* \_\_\_\_\_ 105

### Producción animal

Bioconcentración de metales pesados (Zn, Hg, Pb) en tejidos de *Ariopsis felis* y *Diplodus annularis* en el río Ranchería, norte de Colombia

[Bioconcentration of heavy metals (Zn, Hg, Pb) in tissues of *Ariopsis felis* and *Diplodus annularis* in the Ranchería river, Northern Colombia]

*C. Doria Argumedo* \_\_\_\_\_ 124

Análisis genético de cinco polimorfismos de nucleótido simple de caseínas lácteas obtenidos con chips genómicos en ganado Holstein de Antioquia, Colombia

[Genetic analysis of five single nucleotide polymorphisms of dairy caseins obtained with genomic chips in Holstein cattle from Antioquia, Colombia]

*J. Padilla-Doval, J. C. Zambrano-Arteaga, J. J. Echeverri-Zuluaga, A. López-Herrera* \_\_\_\_\_ 137

Calidad composicional y concentración de ácidos grasos omega-3 (alfa-linolénico) y omega-6 (linoleico) presentes en leche bovina de tres regiones naturales del Ecuador [Compositional quality and concentration of omega-3 (alpha-linolenic) and omega-6 (linoleic) fatty acids present in bovine milk from three natural regions of Ecuador]  
*D. C. Alvear, J. D. Guerrero, N. F. Bonifaz, P. F. Noriega* \_\_\_\_\_ 150

Instrucciones para los autores y consideraciones éticas \_\_\_\_\_ 170

Instructions for authors and ethical considerations \_\_\_\_\_ 173

Instruções aos autores e considerações éticas \_\_\_\_\_ 176

**INDEXACIÓN:**

La REVISTA DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y DE ZOOTECNIA de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá D. C., se encuentra referida en los siguientes índices y bases de datos:

Nacionales:

- SciELO Colombia

Internacionales:

- SciELO Citation Index - Web of Science (Thomson Reuters)
- CAB-Abstracts (CAB International)
- Redalyc
- DOAJ (Directory of Open Acces Journals)
- LILACS
- Latindex (UNAM)
- e-Revistas
- Dialnet

Nuestros contenidos Open-Access se pueden consultar y descargar en:  
[www.revistas.unal.edu.co/index.php/remevez/index](http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/remevez/index)

## Política editorial

La *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia* fue creada en 1929 por el doctor Doménico Geovine, decano de la Escuela Nacional de Medicina Veterinaria, hoy Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. En el medio universitario y en el área pecuaria, es la revista con mayor antigüedad. Desde su creación, su objetivo ha sido ofrecer un medio escrito de expresión para toda la comunidad académica global, en el cual exponer sus ideas, resultados de investigación, ensayos, etc., relacionados con el quehacer científico en el área de las Ciencias Animales y otras afines. Su filosofía ha sido la de tener un carácter abierto, decididamente transparente y democrático, no solo en la participación de los articulistas, sino en los procedimientos internos de gestión. La *Revista* busca cumplir con sus objetivos de divulgar los trabajos de investigación, documentos críticos y de revisión técnico-científica y, con ello, difundir el conocimiento entre profesionales de las áreas pecuarias, siempre en la búsqueda de información pertinente y actualizada de temas relacionados con el sector y propendiendo por obtener reconocimiento con la comunidad en general, a través de la edición de contenidos que permita la interacción de la Academia con el medio.

**Periodicidad:** cuatrimestral

### Arbitraje

Los manuscritos y propuestas de publicación serán evaluados por medio de criterios explícitos, según el tipo de material, por pares académicos mediante la modalidad de doble ciego con cuando menos dos evaluadores por manuscrito. La evaluación procurará identificar los aportes a la innovación científica, tecnológica o pedagógica de las propuestas, frente al estado vigente de conocimiento en una disciplina. Los evaluadores deben emitir un concepto de aprobación, modificación o reprobachión y, en caso de un concepto dividido por parte de los evaluadores, el manuscrito será enviado a un tercer evaluador experto en el área para definir si se acepta o se rechaza. Así mismo, el Comité editorial o el editor en jefe podrán recomendar o negar la publicación del manuscrito, o solicitar la corrección de forma o de fondo del mismo.

Los criterios por aplicar en la evaluación académica de los manuscritos y propuestas son los siguientes:

- Pertinencia de contenido o temática: los textos deberán abordar las cuestiones que resulten relevantes de manera directa o indirecta, para la comprensión de alguna de las disciplinas y profesionales de la salud y la producción animal.
- Rigor argumental: los trabajos deberán tener un pensamiento formal coherente y lógico.
- Coherencia metodológica: los materiales deben presentar concordancia entre el planteamiento del problema, los objetivos, los resultados y las interpretaciones.
- Claridad conceptual: correspondencia entre términos científicos o técnicos empleados en la finalidad temática.





## **Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia: cien años aportando a la salud y a la producción animal**

Podemos decir que el nacimiento de la medicina veterinaria en Colombia se inició en 1881, cuando Jerónimo Triana Silva, profesor universitario, botánico, médico y farmacólogo, viajó a Francia como cónsul general de los Estados Unidos de Colombia y se encargó de conseguir a un médico veterinario para desarrollar esta profesión en el país. Contactó al veterinario de la Escuela Imperial de Lyon, el doctor Claude Vericel Anier, quien llegó a Colombia e inició sus actividades en 1884, año en el que se le encomendó la enseñanza de la carrera en el Instituto Nacional de Agricultura en Bogotá y en el que se creó el primer curso de veterinaria en la Nación, cuya duración era de 3 años. Vericel, en 1885, impartía docencia y hacía labores de clínico, de zootecnista, de bacteriólogo y de extensionista. Empezaba también la labor de investigación en el campo de la veterinaria para Colombia, fundando la primera Escuela Nacional de Veterinaria, la cual fue tempranamente adscrita a las Escuelas de Medicina y Ciencias Naturales de la Universidad Nacional, en el año de 1887. En febrero de 1885, se iniciaron labores en la carrera de Veterinaria, de la cual se graduó la primera promoción de veterinarios en Colombia, entre ellos el doctor Federico Lleras Acosta, quien en 1925 fue nombrado en la Rectoría de la Escuela Nacional de Veterinaria. La guerra de los Mil Días obligó el cierre de la Universidad en 1899.

Durante el periodo de la posguerra, en 1914, se creó el Instituto Colombiano de Agricultura y Veterinaria y, de 1916 a 1922, bajo la dirección de la misión belga, funcionó la Escuela Superior de Agronomía y Veterinaria. Su primer director fue Charles Denemoustier, agrónomo belga de la Escuela Agrícola de Gembloux. En sus primeros años, la Escuela se instaló en la finca Aranjuez, en Chapinero (Bogotá), y posteriormente se trasladó a la carrera 6a con calle 9a, a la carrera 6a con calle 11, a la Huerta de Jaime y al vecino municipio de Mosquera, en el año de 1922.

En agosto de 1920 se aprobó el proyecto de ley por el cual se creó una Escuela Nacional de Veterinaria, que fue acogido por una Comisión de la Cámara de Representantes. En ese mismo año se expidió la Ley 44 de 1920, por la cual se creó la Escuela Nacional de Veterinaria, y sus primeras actividades académicas iniciaron el 10 de mayo de 1921, en Bogotá. Gracias a todo esto, en el presente año conmemoramos el centenario del inicio de labores de aquella institución, nuestra escuela.

La Escuela Nacional de Veterinaria perteneció al Ministerio de Instrucción Pública hasta 1927; luego, al Ministerio de Industrias y, en 1934, al Departamento de Ganadería. Finalmente, en 1935, se reincorpora a la Universidad Nacional de Colombia con el nombre de Escuela de Medicina Veterinaria. En 1944, se propuso adicionar a la Facultad el término *Zootecnia*; de esta manera, se formalizó la disciplina de la producción animal y se incrementaron las asignaturas, las investigaciones y los estudios en esta área. En 1946, los doctores Heliodoro Bonilla Guzmán y José Velásquez Q., profesores de la Facultad, se convierten en verdaderos propulsores y creadores de la Zootecnia en Colombia. La carrera, desde esta fecha, fue llamada Medicina Veterinaria y Zootecnia y, en 1964, se propone el inicio de 2 programas diferentes: el de Medicina Veterinaria y el de Zootecnia. Gracias a ello, en 1969, se gradúan los primeros zootecnistas en la Facultad y en el país.

Esta escuela es pionera también en la proposición de programas de posgrado: en 1966 se inició la primera maestría en conjunto con el ICA (programa especial de graduados [PEG]), la cual funcionó hasta 1989, cuando se creó el programa de maestría en Reproducción Animal en la Facultad. Desde 1991, este programa lleva el nombre de Maestría en Salud y Producción Animal, e incluye diversas líneas de investigación. En 1995 se creó el doctorado en Ciencias – Salud Animal o Producción Animal con las mismas líneas de la maestría y, en el año 1999, se propuso el primer programa de especialidad: la especialización en Anatomopatología Veterinaria, que inició labores en el año 2000. Actualmente, se están presentando, a nivel central de la Universidad, 6 nuevos programas de especialidad en medicina y clínica y 2 especializaciones en producción animal. Hasta el momento, la Facultad ha graduado 405 médicos veterinarios zootecnistas, 2998 médicos veterinarios, 2051 zootecnistas, 34 especialistas, 210 magísteres y 32 doctores.

A día de hoy, nuestra facultad cuenta con la oferta de los programas de pregrado en Medicina Veterinaria y Zootecnia, y los posgrados de especialidad, maestría y doctorado. En todos estos, asumimos responsabilidades trascendentales en diversos niveles: con nuestros estudiantes, tenemos la obligación de ofrecerles programas de alta calidad con una formación ética, imprescindible a lo largo de toda la carrera. Con la sociedad, nos comprometimos a formar y graduar profesionales idóneos, responsables y éticos, que amen sus carreras y aporten con su trabajo al desarrollo de la salud y la producción animal. Con el país, aceptamos la responsabilidad de la producción del nuevo conocimiento, en cabeza de nuestros docentes investigadores, quienes durante todos estos años han impactado, y siguen haciéndolo, con nuevos desarrollos en estas áreas. Con los animales, de compañía, silvestres y de producción, el objeto de estudio de nuestras carreras, asumimos el deber de darles la mejor atención que nuestros profesionales puedan ofrecer. Por último, con la salud humana, desde el campo de la veterinaria, tenemos el mandato de diagnosticar, prevenir, controlar y erradicar las enfermedades transmisibles entre los animales y el hombre; y, desde el campo de la zootecnia, la obligación de proponer sistemas de producción más eficientes que aporten a los cambios de los patrones actuales de producción y al consumo de proteína de origen animal de la mejor calidad.

Iniciamos una nueva centuria conscientes de los nuevos retos surgidos a raíz del cambio climático y de la necesidad de nuevos sistemas de producción sostenible. Comenzamos este nuevo periodo, atendiendo la exigencia de preservación de la diversidad y de los ecosistemas estratégicos, y escuchando el reclamo por formas de alimentación inocua y saludable. Empezaremos también pensando en la saturación de los mercados laborales, en la reclamación por nuevos modelos de educación y en las evidentes crisis sociales y culturales. Estaremos atentos a estos desafíos y mantendremos firmes los compromisos que tenemos con la salud y el bienestar de los animales, con la formación de nuestros estudiantes, con la Universidad, con el sector pecuario y con el país.

**Lucía Botero Espinosa**

Médica veterinaria, M. Sc., Ph. D.

Decana de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia

## Prevalence and effect of intramammary infection due to coagulase-negative staphylococcal (CNS) species in somatic cell counts in milk from Holstein dairy cows in Boyacá, Colombia

R. J. Andrade-Becerra<sup>1\*</sup>, L. E. Tarazona-Manrique<sup>2</sup>, J. C. Vargas-Abella<sup>3</sup>

Artículo recibido: 19 de marzo de 2020 - Aprobado: 22 de octubre de 2020

### ABSTRACT

Mastitis is one of the most important illnesses in specialized dairy herds worldwide due to the effects on production and animal health. The types caused by CNS has a special importance in a production where the main pathogens are controlled. The objective of the present work is to determine the prevalence of CNS in a dairy herd in Boyacá and also quantify the effects of every species of CNS in SCC. 40 cows were selected and sampled during 6 months, CMT was performed, and results from 1 to trace were sampled. The routine bacteriological test was also performed for CNS identification, and the isolating of CNS was performed through rpoB gene identification and through the type of strain using the pulse gel electrophoresis procedure. Out of 960 samples, 619 were positive for CNS growth. The most prevalent species were *Staphylococcus epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. sciuri*, *S. simulans*, *S. haemolyticus* and *S. capitis*. The results that were found here are similar to the results observed in different parts of the world, which confirms that they are pathogens that must be constantly evaluated because they can go unnoticed in routine controls, especially in those farms where major pathogens are not a serious problem. The results determined in this study demonstrate that CNS generates a slight increase in somatic cells.

**Keywords:** Mastitis, California mastitis test, coagulase-negative staphylococcus, somatic cell count.

## Prevalencia y efecto de la infección intramamaria debida a especies de estafilococos coagulasa negativo (ECN) en el conteo de células somáticas en leche de vacas Holstein en Boyacá, Colombia

### RESUMEN

La mastitis es una de las enfermedades más importantes en los rebaños lecheros especializados alrededor de todo el mundo debido a los efectos sobre la producción y la salud animal. Los tipos ocasionados por estafilococos coagulasa negativo (ECN) tienen una importancia especial en una producción en la que los principales patógenos están

<sup>1</sup> Gipatracol research group, laboratory of milk quality analysis and mastitis control. School of veterinary medicine and zootechnics. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, sede Tunja (Colombia). roy.andrade@uptc.edu.co

<sup>2</sup> Gipatracol research group, laboratory of milk quality analysis and mastitis control. School of veterinary medicine and zootechnics. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, sede Tunja (Colombia).

<sup>3</sup> Gipatracol research group, Laboratory of milk quality analysis and mastitis control. School of veterinary medicine and zootechnics. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, sede Tunja (Colombia).

controlados. El objetivo del presente trabajo es determinar la prevalencia del ECN en un hato lechero en Boyacá y cuantificar los efectos de cada especie de ECN en el conteo de células somáticas (CCS). Se seleccionaron 40 vacas y se tomaron muestras durante 6 meses, se realizó californina mastitis test (CMT) y se tomaron muestras de los resultados desde 1 hasta donde hubo trazas. También se realizó la prueba bacteriológica de rutina para la identificación del ECN y el aislamiento del ECN se realizó mediante la identificación del gen *rpoB* y del tipo de cepa, usando el procedimiento de electroforesis en gel de pulso. De 960 muestras, 619 fueron positivas para el crecimiento del ECN. Las especies más prevalentes fueron *Staphylococcus epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. sciuri*, *S. simulans*, *S. haemolyticus* y *S. capitis*. Los resultados encontrados aquí son similares a resultados en diferentes partes del mundo, lo que confirma que son patógenos que deben ser evaluados constantemente porque pueden pasar desapercibidos en los controles de rutina, especialmente en aquellas fincas donde los patógenos mayores no son un problema grave. Los resultados determinados en este estudio demuestran que el SNC genera un ligero aumento de células somáticas.

**Palabras clave:** mastitis, prueba de mastitis California, estafilococos coagulasa-negativos, conteo de células somáticas.

## INTRODUCTION

Mastitis caused by intramammary infection (IMI) is one of the most important illnesses in specialized dairy herds worldwide due to the effects on mammary tissue, the decrease of milk production, the poor quality of raw milk, the increase of culling rate of animals, and the additional expenses for treatments and milk that is lost because of the antibiotic treatment (Taponen *et al.* 2016; Krishnamoorthy *et al.* 2016). Globally, the focus of control programs is for major pathogens like *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*, but it is important to analyze also minor pathogens like coagulase-negative *Staphylococcus* species, which are one of the most prevalent groups that cause subclinical mastitis in dairy cows (Vanderhaeghen *et al.* 2014; Tarazona *et al.* 2019).

*Staphylococci* are a diverse group of gram-positive cocci, which can infect the mammary gland. For intramammary infection diagnosis, *Staphylococci* are classified according to its ability to coagulate

plasma in coagulase-positive or coagulase-negative, the microbiological test used to make this determination is the rabbit plasma coagulase test (Andrade *et al.* 2012). Coagulase-negative *staphylococcus* (CNS) can be found in teat canals, teat skin and teats ducts. They are classified as minor pathogens causing mastitis, and they rarely differ when IMI is diagnosed, it is also possible that they can cause food-borne disease due to pathogenic factors (De Freitas *et al.* 2013; Levinson *et al.* 2016; Dufour *et al.* 2012).

The CNS regularly isolated in subclinical mastitis are *Staphylococcus epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. sciuri*, *S. simulans*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. xylosum*, *S. equorum*, *S. capitis* and *S. auricularis* (Andrade *et al.* 2012; Andrade *et al.* 2018). These bacteria are sometimes referred to environmental staphs, and they are the most frequent organisms isolated from milk samples obtained in herds that have controlled the major pathogens (Krishnamoorthy *et al.* 2016; Dufour *et al.* 2012). They

are also related with a mild increase of somatic cells count (SCC) in bulk milk in a herd, and with an increase in IL-6 in milk and serum, in concentrations up to 20 times more than in clinically healthy cows (Thorgberg *et al.* 2009; Bochniarz *et al.* 2017), and in acute-phase inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4. However, there is no consensus regarding the effects of IMI with NEC on milk production, and its physicochemical characteristics (Tomazi *et al.* 2015).

Some cows with IMI caused by CNS species like *S. chromogenes*, *S. simulans*, and *S. xylosus* had a SCC similar to that observed in IMI caused by *S. aureus*, others like *S. auricularis* had minimal impact in SCC (Tomazi *et al.* 2015; Supré *et al.* 2011). In Colombia, the studies focused on the previous topic are few (Andrade *et al.* 2014; Tarazona *et al.* 2019). Therefore, due to the absence of data related with the prevalence of CNS in Colombia and due to the variability in SCC in IMI caused by CNS, the objective of this study was to determine the prevalence of CNS in a dairy herd in Boyacá and also quantify the effects of every species of CNS in the SCC.

## MATERIALS AND METHODS

### Population and sampling

The research was carried out in the municipality of Paipa. A longitudinal, prospective, descriptive study was developed. 1 herd was included in the study, this one had a total of 72 animals in production, of which 40 Holstein cows between 2 and 4 calvings, and between 60 and 90 days in milk (DIM), were selected. These cows corresponded to 55% of the animal presents in the herd. The average bulk tank milk somatic cell count (SCC) in

the last month was 232.000 cells/ml, and 845 l of milk was produced per day on average. They grazed on kikuyu (*Cenchrus clandestinus*), and they received water *ad libitum*. The milking system was mechanic with 1 operator.

This research was approved by the Research Ethics Committee of the Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC), sede Tunja (Approval letter, 22 April 2019).

### Sampling and transport

Monthly, milk samples were taken from every teat, between July and December 2019. The samples were taken following the instructions from the National Mastitis Council (2017). All mammary glands were evaluated and no one showed apparent signs like pain or inflammation such as reddish tones in the mammary gland, tenderness, adhesions, and hard areas. Later California mastitis tests (CMT) were performed in all teats. The CMT results were scored and interpreted as either (Godden *et al.* 2017) 0 (negative or no thickening of mixture), trace (slight thickening), 1 (+, or low thickening but no tendency to form a gel) 2 (++, or immediate thickening, with a slight gel formation), or 3 (+++, or gel formed, and the surface of the mixture becomes elevated) inflammatory response based on the viscosity of the gel formed by mixing reagent with milk (Tarazona *et al.* 2019; Mendoza *et al.* 2017; Tolosa *et al.* 2013).

Milk samples were taken from every teat that showed 0, trace, and 1 results. They were stored in sterile plastic bags, the procedure described by the National Mastitis Council (NMC) was followed (NMC, 2004). The collected samples were kept and transported under refrigeration until they arrived at the laboratory for analysis

(Tarazona *et al.* 2019). All samples were taken by a veterinarian and transported under refrigeration to the milk quality analysis and mastitis control laboratory (MQAMC). They also were transported to the Veterinary Microbiology Laboratory (VML) of the Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia in Tunja.

### Bacteriological tests and species identification

A routine diagnosis was carried out, also the isolation of non-common microorganisms following the methodology proposed in the Laboratory Handbook on Bovine Mastitis, by the NMC (NMC, 2017). 1 ml of milk sample were inoculated on sheep blood agar. After that, the samples were incubated during 24 hours in an aerobic medium at 37°C, gram staining (positive), hemolysis pattern, catalase reaction (positive), and coagulase tests (negative) (Soler *et al.* 2019; Thorgberg *et al.* 2009). Milk samples that showed growth of 3 or more species of pathogens were considered contaminated, and they were excluded (Dufour *et al.* 2012; Koop *et al.* 2012).

### Genetic characterization of CNS

The identification of each CNS species was carried out in a private external laboratory through the identification of the *rpoB* gene, through real-time PCR. However, it was not possible to access the primer sequences.

### Colony Forming Units and SCC

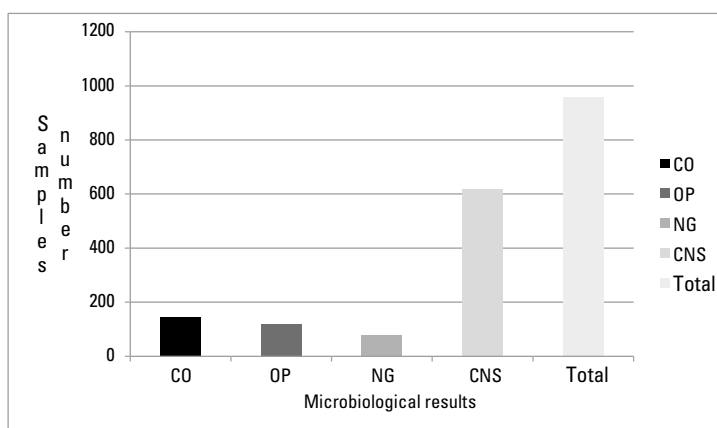
SCC was performed using Fossomatic 4000™ equipment from the FOSS Company®, and Colony Forming Units/ml (CFU/ml) was performed using a Bacto-Scan™ FC+ (Vásquez *et al.* 2012).

### Definition of positive case

A positive case (for every mammary quarter) was considered infected by CNS when growth of > 500 Colony Forming Units/ml (CFU/ml) of a particular organism and only one colony type on the plate were isolated (Dieser *et al.* 2014; Raspanti *et al.* 2016).

### Statistical analysis

All the data were grouped in an Excel document for windows 2010. Later, they were



**FIGURE 1.** Results of microbiological characterization of milk samples. CO: Contaminated; OP: Others Pathogens; NG: No growth; CNS: Coagulase Negative Staphylococcus

processed through the statistical program Statgraphics centurion XVI®. Average Geometric measurement SCC was calculated using monthly dates for every infected teat. The correlation between CNS species causing a positive case and average geometric count SCC were compared using variance analysis of Kruskal-Wallis (Anova) with comparison for peers post-hoc ( $P < 0,05$ )

## RESULTS

### Microbiological characterization

Due to the fact that each teat was evaluated separately, a total of 960 samples of milk were taken. The results of the

microbiological analyses were: 1) 144 contaminated samples (15%); 2) 120 samples with growing of others type of pathogens principally *Streptococcus* spp. and *Corynebacterium* spp. (12,5%) and 3) 77 samples without growing (8%) (figure 1).

The 619 remaining samples (64,47%) were positive for almost 1 strain of CNS. 11 species of CNS were identified (table 1). The duration of infection ranged between 1 and 6 months. Species like *S. epidermidis* and *S. chromogenes* were found in several samples in 1 month with high numbers of colonies, while species like *S. hyicus*, *S. auricularis* and *S. equorum* were found in samples in all 6 months with few colonies (table 1).

**TABLE 1.** Percentage of isolations for every species of CNS and geometric mean of SCC. The letters indicate membership in a statistical group, different letters indicate the statistical difference between groups

Species of CNS	Number of isolations	Percentage of isolation (%)	Geometric mean Of SCC $\times 10^3$ cell/mL*	p < 0,05
<i>S. epidermidis</i>	87	14,05	250	a
<i>S. chromogenes</i>	115	18,57	200	ab
<i>S. sciuri</i>	65	10,5	240	a
<i>S. simulans</i>	76	12,27	220	a
<i>S. haemolyticus</i>	58	9,36	230	a
<i>S. capitis</i>	70	11,3	190	ab
<i>S. hominis</i>	34	5,49	36	d
<i>S. xylosus</i>	23	3,71	80	c
<i>S. equorum</i>	8	1,29	40	d
<i>S. auricularis</i>	32	5,16	15	e
<i>S. hyicus</i>	36	5,81	12	e
Mixed CNS	15	2,42	87	c
Total	619	100		

Statistical differences ( $p < 0,05$ ) were found in the median geometric mean of SCC between species of CNS. The major results of SCC were found for six species of CNS, which were *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. sciuri*, *S. haemolyticus* and *S. capitis*. For the remaining CNS species, values less than  $100 \times 10^3$  cell/ml were found, and the mixed infection (*S. auricularis* and *S. equorum*) had a result of  $87 \times 10^3$  cell/ml (table 1).

## DISCUSSION

Many factors are associated with an increase of SCC. Even in the absence of bacterial growth, this increase leads usually to traumatic damages (lacerations, cuts, injuries), that get worst due to chemical irritants or external conditions, causing that the teats or the udder, in general, get affected, and increasing the somatic cell count. This could explain the absence of growth of bacterium colonies in the 77 samples (Andrade *et al.* 2018; Tarazona *et al.* 2019).

CNS are minor pathogens that caused mastitis. They are important in the dairy industry worldwide, however, their importance had not been previously evaluated in Colombia. In this study a total of 619 samples (64,47%) were positive to almost 1 CNS species by cultured as well as by pulse gel electrophoresis. These results were similar to those reported by (Hosseinzadeh & Dastmalchi 2014), who determined in Iran that 68,35% of isolations in mastitis milk samples corresponded to CNS; nonetheless, these results were higher compared to the results of Taponen *et al.* (2016), who in Finnish farms determined IMI due to CNS in the 13,35% of the samples.

Studies in CNS causing mastitis in dairy cows show a wide variation in the

prevalence of distinct species. Hosseinzadeh & Dastmalchi (2014) showed that the CNS species more prevalent in their study were *S. haemolyticus* (40,7%) and *S. chromogenes* (15,7%), results that were higher than the one reported here. However, Bochniarz *et al.* (2017) reported that *S. xyloso*, *S. chromogenes*, *S. haemolyticus*, *S. simulans* and *S. sciuri* were the most prevalent species in subclinical mastitis milk samples, all these species were found in the present study. Another study in the United States carried out by Gillespie *et al.* (2009) showed that *S. chromogenes* and *S. epidermidis* were the most prevalent species in dairy herds.

Jenkins *et al.* (2019) in several dairy herds in the United States showed that the most prevalent species of CNS present in that country were *S. chromogenes* followed by *S. haemolyticus*, *S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. auricularis*, *S. sciuri*, *S. devriesei*, *S. capitis*, *S. cohnii* and *S. warneri*, results that were similar to those reported here.

In 89 Canadian herds, Fry *et al.* (2014) reported that 46% of the samples were positive for one of the 20 species of CNS. These results are lower compared to the results showed here. From those isolations, *S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* and *S. xyloso* were the most prevalent, results that were similar to those reported here. This similarity showed that CNS had parallel behavior in Colombia compared to North American countries.

However, results by De Freitas *et al.* (2013) in Brazil determined that *S. hyicus*, *S. warneri* and *S. epidermidis* were the most prevalent species in dairy herds in São Paulo, results that were different from those described here, principally related to *S. warneri*. Similarly, Costa *et al.* (2008) studied IMI caused by CNS in Brazilian



herds located in the states of São Paulo and Pernambuco. They reported that *S. warneri*, *S. hyicus*, *S. chromogenes*, and *S. epidermidis* were the most prevalent.

In Argentina, Raspanti *et al.* (2016) determined the prevalence of CNS in dairy herds, showing that *S. chromogenes*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. xyloso*, *S. simulans* and *S. epidermidis* were the principal pathogens present in Argentinian dairy cows, results similar to those found here.

All these studies showed that regardless of the country the species that can infect the mammary gland were similar, and that this similarity can be due to similar management practices between herds evaluated. Also, in several countries management control can be used to combat the pathogens to achieve similar results.

Various factors are associated with pathogenicity, sustainability and spreading of CNS in cows. Factors such as hemolytic and proteolytic activity, higher tolerance to post milking teat disinfection, and the ability to evade immune mechanisms might provide colonization advantages for some species like *S. chromogenes* and *S. haemolyticus* in the mammary gland (Bochniarz & Wawron 2012; Hosseinzadeh & Dastmalchi 2014; Piessens *et al.* 2012; Quirk *et al.* 2012).

With respect to SCC, the statistical analyses showed that the species *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. sciuri*, *S. simulans* and *S. haemolyticus* have not statistically differences between the average geometric count of SCC determined for each species, which means that the increases in SCC are similar when any of these pathogen are present in mammary glands. However, not all species generated a similar SCC average (table 1).

The SCC results found here for *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. sciuri*, *S.*

*simulans* and *S. haemolyticus* were higher than the obtained by Thorgberg *et al.* (2009), who determined values of SCC for milk samples of persistent or non persistent subclinical mastitis with the same pathogens,  $223 \times 10^3$  cells/ml and  $189 \times 10^3$  cells/ml, respectively. But our results were lower compared to the results of Dufour *et al.* (2012), who found for *S. chromogenes* a SCC of  $277 \times 10^3$  cells/ml; for *S. haemolyticus*,  $662 \times 10^3$  cells/ml; and for *S. simulans*,  $525 \times 10^3$  cells/ml. These differences may be due principally to factors associated with cow immunity, and the quantity of CFU chosen to determine a positive case (1000 CFU/mL), while in this study it was 500 CFU/mL.

It has been shown that *S. epidermidis*, *S. chromogenes* and *S. simulans* generally induced a mild to strong inflammatory reaction as measured by CMT (CMT scores 3-5), whereas persistent IMI with others CNS species, including *S. xyloso* and *S. haemolyticus*, mostly had a low CMT score (1-2) (Vanderhaeghen *et al.* 2014). Our findings were different to those proposed by Vanderhaeghen *et al.* (2014) due to the pathogens mentioned above in our study, which show CMT scores between trace and 1, and these were related to those mentioned by Taponen *et al.* (2006), who said that these pathogens can cause subclinical and clinical mastitis in similar proportions.

Sampimom *et al.* (2009) found lower results with respect to SCC related with *S. chromogenes*, *S. epidermidis* and *S. capitis* of 192, 132, and  $187 \times 10^3$  cells/ml, respectively. However, for *S. xyloso* the results were  $400 \times 10^3$  cells/ml, values that were higher compared to our results. These results were similar to those mentioned by Supré *et al.* (2011), who mentioned that *S. simulans* and *S. xyloso* can had a

substantial effect on milk SCC, an effect comparable to that of *S. aureus*.

In their study, Fry *et al.* (2014) obtained similar results related to the principal pathogenic species (*S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. xylosum*, *S. capitis* and *S. haemolyticus*). They did not find statistical differences between SCC in milk samples of dairy herds in the USA, and they mentioned that these pathogens are primarily of environmental origin, and therefore these species may be acting as opportunistic mastitis pathogens.

An increased prevalence of CNS IMI is associated with several cow and herd level factors, but not with any specific milking or housing system (Taponen *et al.* 2016). It has been demonstrated that the principally source of CNS was the environment (Piessens *et al.* 2011), Nagase *et al.* (2002) demonstrated that CNS like *S. warneri*, *S. hominis* and *S. capitis* can be found in dairymen, which means that these can be a potential source for colonization of these species in bovine udder tissue, as these species are commonly found living on the skin and the mucous membranes of humans. Also, Thorgberg *et al.* (2009), who used the same technique as in the present study, found *S. epidermidis* in milk, and the milker's skin, which indicated that this pathogen may be transmitted from the milkers to cows.

## CONCLUSIONS

There were determined 11 species of CNS in IMI in cows from Boyacá, Colombia, and the most prevalent species were *S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. xylosum*, *S. capitis* and *S. haemolyticus*. All of this species have an SCC lower than  $250 \times 10^3$  cells/ml. The results found here are similar to results in different parts

of the world, which confirms that they are pathogens that must be constantly evaluated because they can go unnoticed in routine controls, especially in those farms where major pathogens are not a serious problem. The results determined in this study demonstrate that the CNS generates a slight increase in somatic cells.

## Conflict of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

## Funding

This research had financing by Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.

## REFERENCES

- Andrade RJ, Pulido MO, Rodríguez CE. 2012. Sanidad de ubre, calidad de leche. 1.<sup>st</sup> ed. Tunja: Editorial Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. 169 p.
- Andrade RJ, Caro ZE, Dallos A. 2014. Prevalencia de mastitis subclínica bovina y su etiología infecciosa en fincas lecheras del altiplano boyacense (Colombia). Rev Cient-Fac Cien V. 4:305-310.
- Andrade RJ, Vargas JC, Caro ZE. 2018. Importancia del conteo de células somáticas en la calidad de la leche de vaca. 1.<sup>st</sup> ed. Tunja: Editorial Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. 139 p.
- Bochniarz M, Wawron W. 2012. Haemolytic and proteolytic activity of coagulase-negative staphylococci isolated from mastitis cows. Pol J Vet Sci. 15:61-65.
- Bochniarz M, Zdzisińska B, Wawron W, Szczubiał M, Dąbrowski R. 2017. Milk and serum IL-4, IL-6, IL-10, and amyloid A concentrations in cows with subclinical mastitis caused by coagulase-negative staphylococci. J. Dairy Sci. 100:9674-9680.
- Costa E, Guimarães P, Faccioli F, Santos H, Langoni J, Arcaro A, Peres A, Cunha M. 2008. Identification of the coagulase-negative staphylococci isolates from bovine mastitis and evaluation of the inflammatory. In: Proc. XXV Jubilee World

- Buiatrics Congress; 2008 July 6-11, Alapította, Budapest, Hungary, p. 73.
- De Freitas F, Borin D, Bodelão V, Merlo P, De Figueiredo J, Langoni H. 2013. Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. *J Dairy Sci.* 96:2866-2872.
- Dieser S, Vissio C, Lasagno M, Bogni C, Larriestra A, Odierno L. 2014. Prevalence of pathogens causing subclinical mastitis in Argentinean dairy herds. *Pak Vet J.* 34:124-126.
- Dufour S, Dohoo R, Barkema H, DesCouteaux L, DeVries T, Reyher K, Roy P, Scholl D. 2012. Epidemiology of coagulase-negative staphylococci intramammary infection in dairy cattle and the effect of bacteriological culture misclassification. *J Dairy Sci.* 95:3110-3124.
- Fry P, Middleton J, Dufour S, Perry J, Scholl D, Dohoo I. 2014. Association of coagulase-negative staphylococcal species, mammary quarter milk somatic cell count, and persistence of intramammary infection in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 97:4876-4885.
- Gillespie B, Headrick S, Boonyayatra S, Oliver S. 2009. Prevalence and persistence of coagulase-negative *Staphylococcus* species in three dairy research herds. *Vet Microbiol.* 134:65-72.
- Godden M, Royster E, Timmerman J, Rapnicki P, Green H. 2017. Evaluation of an automated milk leukocyte differential test and the California Mastitis Test for detecting intramammary infection in early- and late-lactation quarters and cows. *J Dairy Sci* 100:6527-6544
- Hosseinzadeh S, Dastmalchi H. 2014. Staphylococcal species associated with bovine mastitis in the North West of Iran: Emerging of coagulase-negative staphylococci. *Int J Vet Sci Med.* 2:27-34.
- Jenkins S, Okello E, Rossito P, Lehenbauer T, Champagne J, Penedo M, Arruda A, Godden S, Rapnicki P, Gorden P, Timms L, Aly S. 2019. Molecular epidemiology of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated at different lactation stages from dairy cattle in the United States. *PeerJ* 7:e6749
- Koop G, De Vlieghe S, De Visscher A, Supré K, Haesebrouck F, Nielen M, van Werven T. 2012. Differences between coagulase-negative *Staphylococcus* species in persistence and in effect on somatic cell count and milk yield in dairy goats. *J Dairy Sci.* 95:5075-5084.
- Krishnamoorthy P, Satyanarayana M, Shome B. 2016. Coagulase Negative Staphylococcal Species Mastitis: An Overview. *Res J Vet Sci* 9(1):1-10.
- Levinson L, Miller E, Tucker A, Bergeron R, Leslie K, Barkema H, DeVries T. 2016. Incidence rate of pathogen-specific clinical mastitis on conventional and organic Canadian dairy farms. *J Dairy Sci.* 99:1341-1350.
- Mendoza J, Vera Y, Peña L. 2017. Prevalencia de mastitis subclínica, microorganismos asociados y factores de riesgo identificados en hatos de la provincia de Pamplona, Norte de Santander. *Rev Med Vet* 64:11-24
- Nagase N, Sasaki A, Yamashita K, Shimizu A, Wakita Y, Kitai S, Kawano J. 2002. Isolation and species distribution of staphylococci from animal and human skin. *J Vet Med Sci.* 64:245-50.
- National Mastitis Council (NMC). 2004. Procedures for the collecting milk samples. In: Oliver S. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection. 4<sup>th</sup> ed. Verona: National Mastitis Council. p. 128
- National Mastitis Council (NMC). 2017. Laboratory handbook on bovine mastitis. 3<sup>th</sup> ed. Verona: National Mastitis Council. 148 p.
- Piessens V, Van Coillie E, Verbist B, Supré K, Braem G, Van Nuffel A, De Vuyst L, Heyndrickx M. and De Vlieghe S. 2011. Distribution of coagulase-negative *Staphylococcus* species from milk and environment of dairy cows differs between herds. *J. Dairy Sci.* 94:2933-2944
- Piessens V, De Vlieghe S, Verbist B, Braem G, Van Nuffel A, De Vuyst L, Heyndrickx M, Van Coillie E. 2012. Characterization of coagulase-negative *Staphylococcus* species from cows' milk and environment based on *bap*, *icaA*, and *mecA* genes and phenotypic susceptibility to antimicrobials and teat dips. *J Dairy Sci.* 95:7027-7038.
- Quirk T, Fox L, Hancock D, Capper J, Wenz J, Park J. 2012. Intramammary infections and teat canal colonization with coagulase-negative staphylococci after post milking teat disinfection: species-specific responses. *J Dairy Sci.* 95:1906-1912.

- Raspanti C, Bonetto C, Vissio C, Pellegrino M, Reinoso E, Dieser S, Bogni C, Larriestra A, Odierno L. 2016. Prevalence and antibiotic susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species from bovine subclinical mastitis in dairy herds in the central region of Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 48(1):50-56.
- Sampimom O, Barkema H, Berends I, Sol J, Lam T. 2009. Prevalence and herd-level risk factors for intramammary infection with coagulase-negative staphylococci in Dutch dairy herds. *Vet. Microbiol.* 134: 37-44.
- Soler L, Dąbrowski R, García N, Alava M, Lampreave F, Piñero M, Wawron W, Szczubiał M, Bochniarz M. 2019. Acute-phase inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4 (ITIH4) levels in serum and milk of cows with subclinical mastitis caused by *Streptococcus* species and coagulase-negative *Staphylococcus* species. *J Dairy Sci.* 102:539-546.
- Supré K, Haesebrouck F, Zadocks R, Vaneechoutte M, Piepers S, De Vliegher S. 2011. Some coagulase-negative *Staphylococcus* species affect udder health more than others. *J Dairy Sci.* 94:2329-2340.
- Taponen S, Simojoki H, Haveri M, Larsen H, Pyörälä S. 2006. Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP. *Vet. Microbiol.* 115:199-207.
- Taponen S, Liski E, Heikkilä A, Pyörälä S. 2016. Factors associated with intramammary infection in dairy cows caused by coagulase-negative staphylococci, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium bovis*, or *Escherichia coli*. *J Dairy Sci.* 100: 493-503.
- Tarazona L, Villate J, Andrade R. 2019. Bacterial and fungal infectious etiology causing mastitis in dairy cows in the highlands of Boyacá (Colombia). *Rev Med Vet Zoot.* 3:208-218.
- Thorgberg B, Danielsson M, Emanuelson U, Persson K. 2009. Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase-negative staphylococci. *J. Dairy Sci.* 92:4962-4970.
- Tolosa T, Verbeke J, Piepers S, Supré K, De Vliegher S. 2013. Risk factors associated with subclinical mastitis as detected by California Mastitis Test in smallholder dairy farms in Jimma, Ethiopia using multilevel modelling. *Prev Vet Med.* 112: 68-75.
- Tomazi T, Gonçalves J, Barreiro J, Arcari M, Dos Santos A. 2015. Bovine subclinical intramammary infection caused by coagulase-negative staphylococci increases somatic cell count but has no effect on milk yield or composition. *J Dairy Sci.* 98:3071-3078.
- Vanderhaeghen W, Piepers S, Leroy F, Van Coillie F, Haesebrouck F, De Vliegher S. 2014. Invited review: Effect, persistence, and virulence of coagulase-negative *Staphylococcus* species associated with ruminant udder health. *J Dairy Sci.* 97: 5275-5293.
- Vásquez J, Loaiza E, Olivera M. 2012. Calidad higiénica y sanitaria de leche cruda acopiada en diferentes regiones colombianas. *Rev Orinoquía.* 16:13-23.

### Forma de citación del artículo

Andrade-Becerra R. J., Tarazona-Manrique L. E, Vargas-Abella J. C. 2021. Prevalence and effect of intramammary infection due to coagulase-negative staphylococcal (CNS) species in somatic cell counts in milk from Holstein dairy cows in Boyacá, Colombia. *Rev Med Vet Zoot.* 68(2):95-104. <https://doi.org/10.15446/rfmvz.v68n2.98024>

## Seropositivity for Bovine Viral Diarrhea and Enzootic Bovine Leukemia viruses in Blanco Orejinegro cattle in Colombia and infection associated-factors

*A. Saldarriaga-Saldarriaga<sup>1\*</sup>, M. Londoño-Gil<sup>2</sup>, L. G. González-Herrera<sup>3</sup>, J. C. Rincón-Flórez<sup>4</sup>, A. López-Herrera<sup>5</sup>*

*Artículo recibido: 26 de septiembre de 2020 - Aprobado: 24 de febrero de 2021*

### ABSTRACT

Serological controls for diseases of viral origin in animal production systems and the identification of factors associated with infections are decisive elements to establish prevention and control measures. The aim of this study was to establish the serological status for Bovine Viral Diarrhea (BVD) and Enzootic Bovine Leukemia (EBL) viruses in Blanco Orejinegro (BON) cattle from Colombia, and to identify the factors associated with seropositivity. A cross-sectional study was conducted with a total of 498 animals of all age groups and physiological states of the BON breed were selected, belonging to 14 herds located in 6 states of Colombia, in which a survey with 27 questions was conducted. By means of the chi-square test, possible factors associated with seropositivity against the 2 viruses were identified. A sample of 4 ml of blood was taken from each animal to extract plasma and make indirect Elisa tests to detect antibodies against both pathogens. General seropositivity of 27,1% was obtained for EBL, finding as factors associated with seropositivity the inadequate disposition of placental tissues after delivery of the cows and the non-performance of serological tests on new animals entering the herd. For BVD, seropositivity obtained was 50,6%, and the factors associated with seropositivity identified were having had a history of the disease in the herd, and using semen from bulls that are not known to be free for the infection. We suggest establishing control measures considering the factors associated with each viral infection to limit their expansion in the BON cattle production systems of Colombia.

**Keywords:** creole cattle, Elisa, serological status, viral diseases

<sup>1</sup> M. Sc. Agrarian Science. Universidad Nacional de Colombia, Medellín campus, Carrera 65 # 59A-110. BIOGEM Research group, Medellín, Antioquia, Colombia. asaldarriagas@unal.edu.co

<sup>2</sup> M. Sc. Biotechnology. Universidad Nacional de Colombia, Medellín campus, Carrera 65 # 59A-110. BIOGEM Research group, Medellín, Antioquia, Colombia. malondonogi@unal.edu.co.

<sup>3</sup> Prof. Dr. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, Carrera 65 # 59A-110. BIOGEM Research group, Medellín, Antioquia, Colombia. luggonzalezhe@unal.edu.co.

<sup>4</sup> Prof. Dr. Universidad Nacional de Colombia, Palmira campus, BIOGEM Research group, Palmira, Valle del Cauca, Colombia. researcher at BIOPEC reaserch group, Universidad Tecnológica de Pereira. jcrincon@unal.edu.co.

<sup>5</sup> Prof. Dr. Universidad Nacional de Colombia, Medellín campus, Carrera 65 # 59A-110. BIOGEM Research group, Medellín, Antioquia, Colombia. alherrera@unal.edu.co

## Soropositividade para o vírus da diarreia viral bovina e leucemia bovina enzoótica em bovinos Blanco Orejinegro na Colômbia e fatores associados à infecção

### RESUMO

Os controles sorológicos para doenças de origem viral nos sistemas de produção animal e a identificação de fatores associados à infecção são elementos decisivos para estabelecer medidas de prevenção e controle. O objetivo deste estudo foi estabelecer o status sorológico dos vírus da Diarreia Viral Bovina (BVD) e da Leucemia Bovina Enzoótica (EBL) em bovinos Blanco Orejinegro (BON) da Colômbia e identificar os fatores associados à soropositividade. Foram selecionados 498 animais de todas as faixas etárias e estados fisiológicos da raça BON, de 14 rebanhos localizados em seis regiões da Colômbia, nos quais foi realizada uma pesquisa para identificar possíveis fatores associados à soropositividade contra os dois vírus. Foi retirada uma amostra de 4 ml de sangue de cada animal para extrair plasma e fazer testes ELISA indiretos para detectar anticorpos contra os dois patógenos. Obteve-se soropositividade geral de 27,1% para EBL, encontrando como fatores associados à soropositividade a disposição inadequada dos tecidos placentários após o parto das vacas e a não realização de testes sorológicos em novos animais que entraram no rebanho. Para a BVD, a soropositividade obtida foi de 50,6%, e os fatores associados à soropositividade identificados foram: histórico de doença no rebanho e uso de sêmen de touros que não são reconhecidos como livres da infecção. Sugerimos o estabelecimento de medidas de controle considerando os fatores associados a cada infecção viral para limitar sua expansão nos sistemas de produção de gado BON da Colômbia.

**Palavras-chave:** gado crioulo, ELISA, status sorológico, doenças virais.

### INTRODUCTION

According to the National Agricultural Survey carried out by Dane (2017), around 79,3% of the land used in 26 states of Colombia is dedicated to livestock activity, being an indicator of the importance of this primary production subsector for the country. Livestock farming is one of the main economic axes of agricultural activity in Colombia. In the early days of Colombian cattle farming, creole breeds comprised the entire bovine population. However, with the arrival of foreign breeds, a substitution process of native breeds

began, initiating a decrease in their population through absorbent crosses (Buitrago & Gutiérrez 1999; MADR 2003), aiming at obtaining animals with higher productivity indicators. This trend caused that characteristics of economic importance of creole breeds, such as reproductive ability, hardiness or rusticity, efficiency in the use of low nutritional quality forages and resistance to diseases, began to be relegated (Martínez 1992). These traits have crucial importance for animal production systems in the tropics, where the climate is hostile, and infectious agents,

parasites and disease-transmitting insects are abundant (Buitrago & Gutiérrez 1999). One of the Colombian creole breeds of high productive importance, due to its adaptation to different thermal altitude zones and also to the environmental and sanitary conditions of Colombia, is the Blanco Orejinegro (BON) cattle breed.

Some studies have been conducted to identify the level of natural resistance of BON cattle to some pathogens. The frequency of natural resistance to bovine brucellosis in unvaccinated animals has been reported to be 18% (Arboleda 2003). Likewise, López-Herrera *et al.* (2002) phenotyped the *in vitro* resistance/susceptibility of BON cattle to the foot-and-mouth disease virus (FMDV), and found that 93% of the animals were resistant to the A24 cruzeiro subtype and 52,8% to the O1 subtype. Another study carried out by Ruiz *et al.* (2015) evaluated the *in vitro* resistance/susceptibility of BON cattle fibroblast cultures to FMDV, and showed that fibroblast culture supernatants with high antiviral activity (ability to inhibit replication of the vesicular stomatitis virus [VSV]), came from cultures highly resistant to the FMDV A24 subtype, and those highly resistant and resistant to the O1 subtype. Meanwhile, the supernatants with low antiviral activity came from the fibroblast cultures most susceptible to the FMDV. Regarding the *in vitro* resistance of BON fibroblasts to VSV infection, López-Herrera *et al.* (2002, 2009) found in this breed, a phenotypic polymorphism for the *in vitro* resistance/susceptibility to the infection by the two VSV serotypes (Indiana and New Jersey), with a higher prevalence of the resistance phenotype in the New Jersey serotype compared to the Indiana serotype. Furthermore, these authors also

reported that the natural resistance to the infection of BON cattle fibroblasts by VSV in the Indiana and New Jersey serotypes is not due to the production of antiviral activity factors, suggesting the presence of other mechanisms involved in the resistance of the BON breed to infection by vesicular stomatitis. These results constitute an important background to begin new research to identify the underlying mechanisms of resistance or tolerance of the BON breed to viral diseases of economic impact for livestock, such as the Bovine Viral Diarrhea (BVD) and Enzootic Bovine Leukemia (EBL), so that the use of the BON breed in livestock production systems can be potentiated.

BVD is a disease caused by a *Pestivirus* that generates economic losses derived from the reduction in milk production, less reproductive performance, less weight gain, and increased mortality, premature discards, and veterinary costs (Houe 2003; Thomann *et al.* 2017). On the other hand, EBL is a disease that is widely distributed worldwide and affects cattle, being caused by a *Deltaretrovirus* (Murakami *et al.* 2011); its economic repercussions on infected herds are reflected in the decrease in milk production ranging from 2,5 up to 5%. It also triggers an increase in the rate of selective losses, as well as a higher susceptibility to other diseases of infectious etiology, such as mastitis, diarrhea, and pneumonia (OIE 2018), and consequently, a higher rate of discard in the herd. Based on the above, the aim of this study was to establish the serological status of Colombian BON cattle against BVD and EBL viruses, and to determine the factors associated with seropositivity, constituting a contribution to the study of the animal health of creole breeds in Colombia.

## MATERIALS AND METHODS

### Ethics aspects

This work obtained the endorsement of the ethics committee of Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín [CICUA 005 of 2016].

### Herds and regions

A survey was carried out in 14 herds dedicated to BON cattle breeding located in 6 departments of Colombia, including Antioquia, Caldas, Cundinamarca, Meta, Risaralda and Tolima. In all the production systems, the animals were under rotational grazing conditions with mineral supplementation, and employing natural matings as the predominating reproduction method.

From the participating herds, 498 animals were randomly selected: 116 males and 382 females from all age groups, with weights ranging from 50 kg to 700 kg. Animal sampling was proportional to the number of animals per herd, with an average of 35 animals selected per herd (a minimum of 11 animals and a maximum of 72). Regarding the state level, 135 animals were located in Antioquia, 72 in Caldas, 137 in Risaralda, 47 in Meta, 94 in Tolima, and 13 in Cundinamarca.

2 regions were formed due to their relationship with the evolution of BON cattle in Colombia. The first one (region 1) included herds located in the departments of Antioquia, Caldas and Risaralda as an important axis in the development of the BON breed. In this region, 344 animals were sampled, of which 271 were females, and 73 males, with an average of 43 animals bled per herd (minimum 10, and maximum 60 animals). The second one (region 2) was comprised of herds located in the departments of Tolima,

Meta and Cundinamarca, places where the BON breed has been expanding. In this region, 154 animals were sampled, of which 111 were females, and 43 males, with an average of 31 animals bled per herd (minimum 13, and maximum 47 animals).

### Serological status evaluation

To each of the 498 animals, a blood sample of 4 ml was taken from the medial coccygeal vein in a tube with EDTA as an anticoagulant. The blood plasma of each sample was separated by centrifugation at 3000 rpm for 10 min at the sampling site, to then be transported under refrigerated conditions to the Animal Biotechnology Laboratory of the Universidad Nacional de Colombia, Medellín campus, where these were kept at  $-20^{\circ}\text{C}$  until processing. Indirect ELISA screening tests were performed following the manufacturer's instructions for antibody detection. For EBL, the SVANOVIR® BLV gp51-Ab kit (Boehringer Ingelheim Svanova, Uppsala, Sweden) with 100% sensitivity and 99,8% specificity was used. For BVD, the SVANOVIR® BVDV-Ab kit (Boehringer Ingelheim Svanova, Uppsala, Sweden) with 100% sensitivity and 98,2% specificity was employed. The MultiWash III model 8441 (TriContinent, Berkshire, UK) was used to wash each of the dishes, and the final reading of each dish was performed at 450 nm using the Biotek Instrument Inc model ELX 800 (BioTek, Winooski, Vermont, USA). Once the results of each of the animals were obtained they were categorized into 2 groups: zero (0) for the animals that were negative in the ELISA test, and one (1) for the positive animals. The data were tabulated in spreadsheets for further analysis.



**Surveys to determine seropositivity associated-factors**

After each sampling per herd, a survey with 27 questions (table 1) involving 5 main axes was carried out to identify the factors associated with serological positivity to BVD and EBL. The 5 axes include: 1) knowledge of the diseases, 2) handling the material used for services, reproductive

check-ups and surgical interventions, 3) management of other animal species that are maintained within the herd, 4) aspects regarding herd personnel and farm certification, and 5) nutritional and sanitary management of animals. All the surveys were digitized into spreadsheets with a rating of zero (0) when the answer to a question was negative, and one (1) when

**TABLE 1.** Elements evaluated in the survey to establish the association with seropositivity to viral infections by Enzootic Bovine Leukemia (EBL) and Bovine Viral Diarrhea (BVD) in Blanco Orejinegro (BON) cattle of Colombia through a Chi-square analysis

No.	Factor	Association with EBL (p-value)	Association with BVD (p-value)
1	Do you have any knowledge about Enzootic Bovine Leukemia and Bovine Viral Diarrhea?	0,807	0,1827
2	Have you had clinical cases of these diseases?	4,46e-11*	2,37e-6*
3	If you find animals with clinical symptoms for these diseases, do you apply any treatment?	6,94e-6*	0,479
4	Do you have an isolation corral for sick animals?	0,250	0,124
5	Once the cows have given birth, do you bury the placentas? Or which is the process that you follow?	0,041*	0,025*
6	If there is an abortion in the herd, what is the management that you give to the aborted fetus?	0,00041*	NA
7	Do calves receive colostrum and milk from the mother or other cows?	NA	NA
8	Do you perform serological tests on new bovine animals entering your herd?	0,00041*	9,2e-9*
9	Do you use disposable needles, one for each animal, to apply medications?	0,00052*	NA
10	Do you wash and disinfect surgical instruments before and after performing interventions on animals or between each animal?	NA	NA
11	Do you use palpation gloves for each animal?	0,773	1
12	Do you disinfect tattooers before and after using them?	3,9e-9*	NA
13	Do you collect semen from BON males on the farm with sterile or new material?	0,295	NA

*Continued*

No.	Factor	Association with EBL ( <i>p</i> -value)	Association with BVD ( <i>p</i> -value)
14	Are the catheters and disposable sleeves new when carrying out the insemination process in females?	0,00060*	0,0051*
15	If the mounting process is with bulls, do you use exclusive bulls for your herd?	0,873	NA
16	Is the semen you use obtained from bulls tested free for these two diseases?	0,00080*	2,63e-5*
17	Are there cats and dogs in the herd?	NA	NA
18	If the previous answer is positive, do you deworm dogs or cats?	NA	NA
19	Do cats and dogs have access to the entire herd, or are they restricted to the housing used by workers?	4,18e-5*	0,0056*
20	What type of schooling does the operating personnel of the herd have? <sup>a</sup>	0,0015*	2,24e-10*
21	How much experience time do the operating personnel have in livestock management? <sup>a</sup>	3,36e-7*	0,120
22	Do the operating personnel have contact with animals from other farms?	0,0432*	0,00036*
23	Are you certified in good livestock practices?	4,24e-9*	0,101
24	What type of supplementation do you use? <sup>a</sup>	0,288	3,07e-5*
25	Do you stable the animals permanently?	0,086	0,552
26	Do you carry out any drinking water treatment for animals?	6,35e-7*	6,35e-7*
27	Do you carry out flies and ectoparasite control?	0,0040*	0,000269*

No.: question number. \*: Significant questions according to the Chi-square test ( $p < 0,05$ ). NA: questions with a single level (a single type of answer [yes or no]) not included in the analysis. <sup>a</sup>: a score of zero (0), one (1), and two (2) was given for the 3 possible response types.

the answer to a question was positive. For the questions in which the answer did not lead to a “yes” or “no” answer (eg question no. 6 of the questionnaire), but which in turn yielded a dichotomous answer, categories of zero (0) and one (1) were similarly assigned. When there were more than 2 possible answers (for example, in questions no. 20, 21, and 24) a rating of zero (0), one (1) and two (2) was assigned to the three types of possible answers.

### Statistical analysis

A descriptive cross-sectional study was carried out. Once the results of the ELISA tests were obtained, the serological frequency for each of the viral pathogens evaluated was calculated as a proportion of animals that were positive to the test concerning the total number of animals evaluated (Motta *et al.* 2013). Following the same methodology, the percentage of seropositive animals for each virus was

calculated, discriminating by sex, herd, and region factors. No clinical evaluations of the animals were performed. A chi-square test was performed to check if there was a significant difference between sexes, regions, and herds ( $\alpha < 0,05$ ). For this last case, the herd that showed the highest seropositivity was taken as reference for comparisons, both for EBL and BVD, ie all the other herds were compared with this one to have an idea of the magnitude of the difference in seroprevalence between herds, and thus, verify the presence of risk factors associated with the disease that are typical of the herds. Additionally, the odds ratio (OR) between sexes, regions, and herds was calculated, taking as a reference, in this case, the mean seropositivity obtained for each viral infection.

To identify which of the factors evaluated in the survey were associated with the diseases, 2 types of analyzes were performed. First, a chi-square test between each of the questions asked in the survey with the serological diagnosis of each of the diseases to determine which of the questions asked were significant ( $p < 0,05$ ), to then be evaluated as a possible factor associated with the infection. Second, once the significant factors were identified and the frequencies of the diagnoses were calculated, the OR corresponding to a quotient between 2 odds was calculated for each; one odd was thought as an alternative way of expressing the possibility of occurrence of an event of interest or presence of an exposure (Cerdeira *et al.* 2013), with its respective 95% confidence interval. From these estimates, the factors associated with seropositivity for the 2 pathogens in the herds were established. The calculations were carried out employing the R software using the *epitools* package with the *epitab* function (R Core Team 2017).

## RESULTS

The overall positivity for EBL in Colombian BON cattle was  $27,10\% \pm 0,44$  (135/498) with a confidence interval (CI 23,19; 31,0), while for BVD, the seropositivity was  $50,63\% \pm 0,49$  (198/391) (IC 45,6; 55,6). The difference in the total number of samples evaluated for the 2 viral infections was because, in 3 of the evaluated herds, the owners had administered the BVD vaccine in their sanitary scheme. Therefore, in the samples of these herds, the seropositivity to BVD was not evaluated because when animals are vaccinated it is not possible to differentiate seropositive post-vaccinated animals from post-infection animals.

Regarding the factors associated with seropositivity for these 2 viral infections in herds, of the 27 evaluated questions presented in table 1, 16 were significant ( $p < 0,05$ ) for EBL according to the chi-square test, and only 2 had a significant OR ( $p < 0,05$ ) and a confidence interval with values higher than 1 (table 2a). Therefore, these were determined as factors associated with the infection, or factors that when they are not controlled give a higher possibility that the herd will be seropositive to EBL. On the other hand, of the 27 questions evaluated, 13 were significant ( $p < 0,05$ ) for BVD according to the chi-square test, and only 3 had a significant OR ( $p < 0,05$ ) and a confidence interval with values higher than 1 (table 2b). Table 3 shows the calculated OR for the sex, region, and herd factors for EBL (table 3a) and BVD (table 3b).

Figure 1 shows the EBL seropositivity graphically for the BON cattle from Colombia, considering the factors sex, herd, and region. After evaluating the sex factor, a seropositivity of 31,15% (119/382) (CI 26,5; 36,0) was found for females, and 13,79% (16/116) (CI 8,33; 21,72) for males, with significant statistical difference

**TABLE 2.** Factors associated with seropositivity for a) Enzootic Bovine Leukemia (EBL), and b) Bovine Viral Diarrhea (BVD) with a significant odds ratio for viral infections in Blanco Orejinegro (BON) cattle of Colombia

<b>a) Factors associated with EBL seropositivity</b>				
<b>Item</b>	<b>Level</b>	<b>Odds ratio</b>	<b>Confidence interval</b>	<b>p-value</b>
Having clinical cases of this disease	Yes	5,17	3,10–8,60	1,73e-11
	No	Reference		
Use of semen from bulls tested free for this disease	Yes	Reference	1,10–2,79	0,020
	No	1,75		
<b>b) Factors associated with BVD seropositivity</b>				
<b>Item</b>	<b>Level</b>	<b>Odds ratio</b>	<b>Confidence interval</b>	<b>p-value</b>
Having clinical cases of this disease	Yes	29,02	3,89–216,14	1,93e-7
	No	Reference		
Burying the placentas once the cows have given birth	Yes	Reference	1,09–2,73	0,021
	No	1,72		
Perform serological tests on new bovine animals that enter their herd	Yes	Reference	1,10–2,85	0,017
	No	1,77		

Source: self-made.

between sexes ( $p = 0,00036$ ) (figure 1a). In the case of the herd factor, seropositivity for EBL varied between 0 and 62,9%, and all herds showed significant statistical differences ( $p < 0,05$ ), showing herd L the highest seropositivity, except for herd B ( $p = 0,39$ ) (figure 1b). Between regions, a seropositivity for EBL of 33,43% (115/344) (CI 28,51; 38,72) was found for region 1, while for region 2 it was 12,98% (20/154) (CI 8,30; 19,57); significant statistical differences were observed between regions ( $p = 3,58 \text{ e-}06$ ) (figure 1c).

Figure 2 shows the BVD seropositivity for Colombian BON cattle considering the factors sex, herd, and region. After analyzed by sex, seropositivity for females showed values of 55,04% (CI 49,29; 60,67),

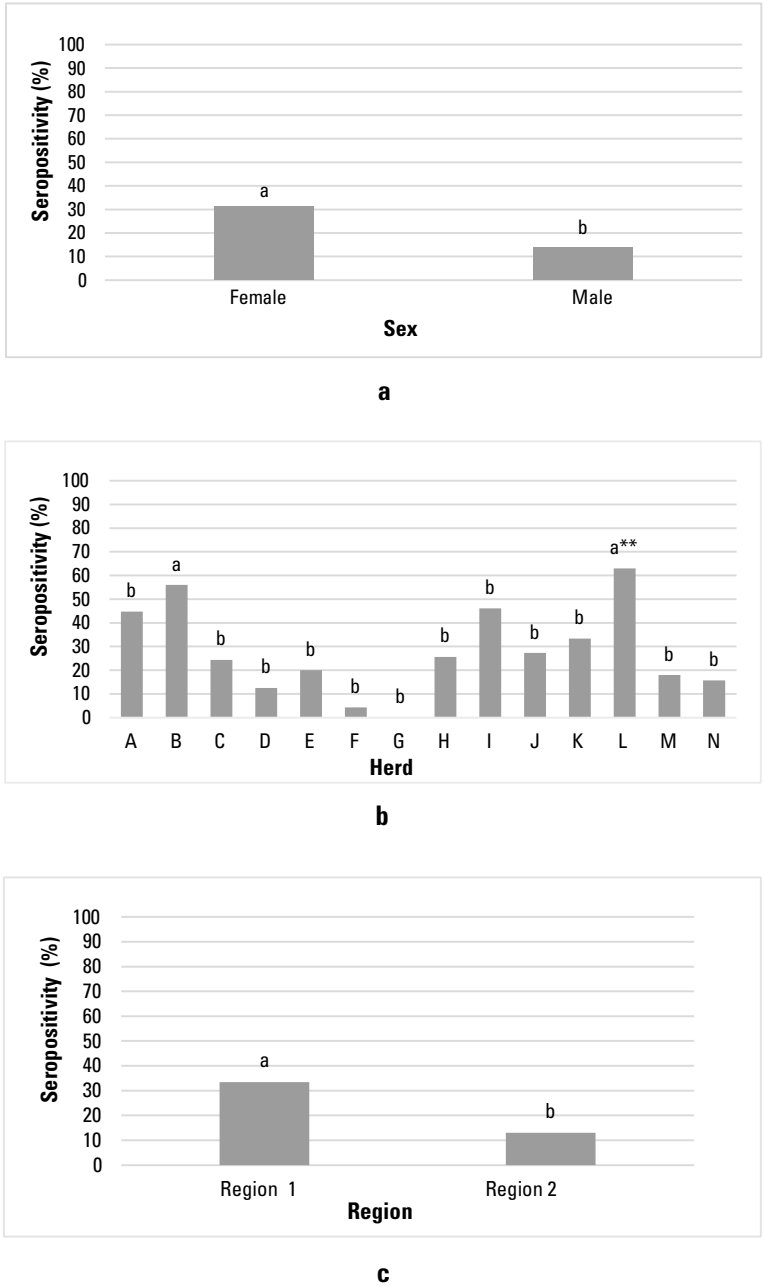
and for males, the value was 34,54% (CI 24,70; 45,77), with a significant statistical difference between the sexes ( $p = 0,0013$ ) (figure 2a). In the case of the herd factor, seropositivity ranged between 28,20% and 96,29%. All herds showed significant statistical differences ( $p < 0,05$ ) compared to the herd with the highest seropositivity (herd I), except herd B ( $p = 0,30$ ) (figure 2b). At the regional level, seropositivity for BVD was 52,81% (CI 46,8; 58,71) for region 1, while for region 2, the seropositivity was 44,85% (CI 35,33; 54,75). No significant difference was found between regions ( $p = 0,1972$ ) (figure 2c). Moreover, it was also evident that, for both infections, the male sex and region 2 showed lower seropositivity.

**TABLE 3** Odds ratio (OR) calculated for sex, region, and herd associated with seropositivity for viral infections in Blanco Orejinegro (BON) cattle from Colombia. a) Odds ratio (OR) for Enzootic Bovine Leukemia (EBL), and b) OR for Bovine Viral Diarrhea (BVD)

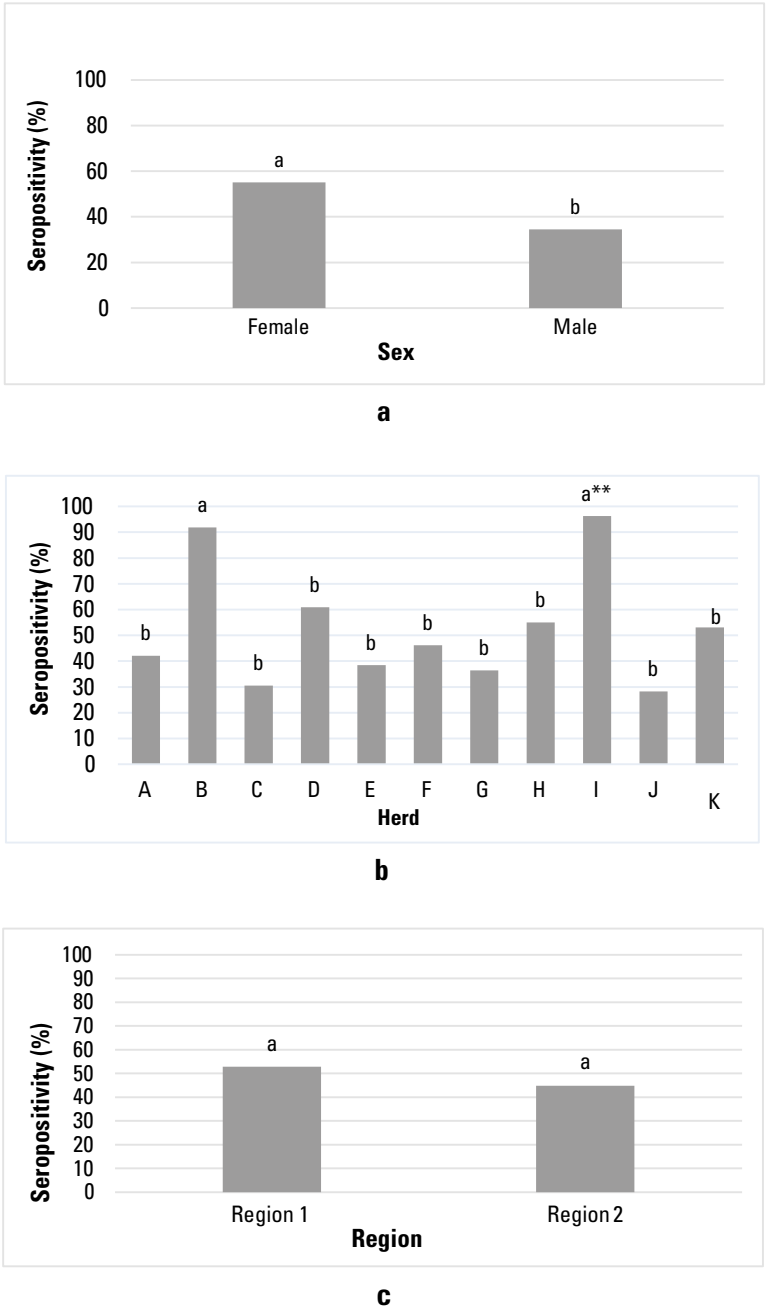
<b>3a) OR for EBL</b>				
<b>Factor</b>	<b>Level</b>	<b>Odds ratio</b>	<b>Confidence interval</b>	<b>p-value</b>
Sex	Male	0,430	0,244–0,755	0,002
	Female	1,216	0,907–1,631	0,202
Region	Region 1	1,350	1,001–1,820	0,0550
	Region 2	0,401	0,241–0,668	0,00021
Herd	A	2,17	1,114–4,250	0,025
	B	3,42	1,892–6,187	6,254e-05
	C	0,864	0,397–1,870	0,848
	D	0,384	0,185–0,790	0,0084
	E	0,672	0,140–3,205	1
	F	0,119	0,028–0,499	0,00015
	G	NA	NA	NA
	H	0,927	0,439–1,950	1
	I	2,304	0,760–6,980	0,203
	J	1,008	0,263–3,850	1
	K	1,344	0,758–2,380	0,359
L	4,57	2,042–10,20	0,000241	
M	0,588	0,253–1,364	0,259	
N	0,497	0,187–1,319	0,213	
<b>3b. OR for BVD</b>				
<b>Factor</b>	<b>Level</b>	<b>Odds ratio</b>	<b>Confidence interval</b>	<b>p-value</b>
Sex	Male	0,513	0,314–0,840	0,0080
	Female	1,193	0,884–1,611	0,253
Region	Region 1	1,091	0,803–1,481	0,585
	Region 2	0,793	0,516–1,218	0,326
Herd	A	0,708	0,361–1,390	0,395
	B	11,047	3,337–36,56	3,88e-07
	C	0,428	0,250–0,735	0,0019
	D	1,516	0,641–3,585	0,394
	E	0,609	0,310–1,196	0,179
	F	0,835	0,275–2,53	0,785
	G	0,556	0,160–1,933	0,379
	H	0,797	0,462–1,376	0,488
	I	25,343	3,405–188,60	8,433e-07
	J	0,382	0,185–0,790	0,010
	K	1,104	0,536–2,27	0,855

Not Available: herd without cases of EBL.

Source: self-made



**FIGURE 1.** Enzootic Bovine Leukemia (EBL) seropositivity in the Colombian cattle breed Blanco Orejinegro (BON) according to the factors: a) sex, b) herd, and c) region. Equal letters do not differ significantly. \*\*: herd used as a basis for comparison  
Source: self-made.



**FIGURE. 2** Bovine Viral Diarrhea (BVD) seropositivity in the Colombian cattle breed Blanco Orejinegro (BON) according to the factors: a) sex, b) herd, and c) region. Equal letters do not differ significantly. \*\*: herd used as a base for comparison

Source: self-made.

## DISCUSSION

Since the first reports of EBL in Colombia, seropositivity has shown some variations depending on the study area, the number of animals sampled, and the breeds evaluated. In this study, general seropositivity of 27,1% for EBL was found in specimens of the BON breed belonging to 14 herds from 6 departments of Colombia. A recent report evaluated the molecular prevalence of EBL infection in a single herd with 3 genetic lines, reporting seroprevalence of 5% for the BON breed, 55,9% for the Holstein breed, and 24% for the BON×Holstein cross, attributing the reduction from the molecular positivity in the BON×Holstein bovines to the possible presence of resistance genes in the BON breed (Úsuga *et al.* 2018). In other studies, serological prevalences of 45,28% have been found in dairy cows in the savannah of Bogotá regions, and also in the valleys of Ubaté and Chiquinquirá (Alfonso *et al.* 1998), as well as in the dairy basin of northern Antioquia in Holstein cattle. Molecular prevalence of the virus of 44% was found in Holstein cattle (Úsuga *et al.* 2015), while in Brahman cattle, an infection level of 6,7% has been found (Hernández *et al.* 2011), highlighting that in the published studies in general, high seroprevalences have always been found in dairy cattle and lower in beef farms. This may explain the results found in the current study of higher serological frequency in region 1 (highly bovine dairy-producing systems) and lower in region 2 (predominantly bovine meat-producing systems, except for the herd located in the department of Cundinamarca).

Hernández *et al.* (2011) evaluated the molecular prevalence of EBL in the 8 creole breeds established in Colombia, finding prevalences with a range from 0%

to 83,3%. In this study, the presence of the EBL genome was not found in the BON breed, but they only evaluated 30 specimens from a single herd; this result contrasts with the results found in our study, where seropositivity of 27,1% was found; even in herd G, no animals were seropositive for EBL (figure 1b). The low seropositivity for infection with the EBL virus in BON cattle compared with specialized breeds such as Holstein might be because the breed may have some unknown immune resistance mechanism, which allows it to respond effectively to the exposure to the virus since mechanisms of resistance to other viral infections have been demonstrated in this breed (López-Herrera *et al.* 2002, 2009; Ruiz *et al.* 2015).

When the EBL seropositivity level was discriminated by sex, an infection rate of 31,15% was found for females and 13,79% for males. Superior results were obtained by Betancur & Rodas (2008) in a study that included zebuine, crossbred and European animals. These authors found a seropositivity level of 68,6% and 31,4% for females and males, respectively, in the Montería region of Colombia. Other studies, such as the one carried out by Vásconez *et al.* (2017), found similar trends in seropositivity levels, ie 77,33% for females and 22,66% for males. In our study, the highest seropositivity rate for EBL in females (31,15%) is lower than previously reported for females of other bovine breeds, but higher than the one registered for BON males in our study. This may be because females are the animals that undergo most manipulation during regular farming practices, such as palpations and inseminations within the herd, processes in which there may be iatrogenic infection with this viral agent.



On the other hand, lower seropositivity in males could translate into a lower rate of EBL spread in the BON herds of Colombia, since in many of them natural matings are carried out, reducing the sexual transmission of the virus. These results agree with the OR calculated for males and females (table 3a), finding that with respect to the overall mean for EBL seropositivity, the OR for females was 1,21. This means that if a seropositivity study for EBL was carried out, the probability of finding a group of seropositive BON females would be 1,21 times higher than the overall mean calculated in this study for EBL, while for males the OR was 0,43, which coincides with the lower seropositivity (13,79%) found for BON males.

When EBL seropositivity was analyzed per herd, a mean of affectation of 27,91% was found with a range of 0,0% to 62,9%; that is, there was at least 1 herd where no antibody titers against EBL were found in the sampled animals, which agrees with the results of Hernández *et al.* (2011). This result would indicate that sanitary management in the herd without seropositivity is outstanding and has prevented the entry of the EBL virus into this herd, or that there may be animals with possible resistance mechanisms to this disease. Similar data were reported by Delgado & Alfonso (2009), in a study in which an average of 25,29%, and a range from 0% to 45,8% was found in 11 herds of adult cattle in 4 provinces of Cuba. Likewise, Romero *et al.* (2015) reported a seroprevalence of 21,8% in a specialized dairy system.

After analyzing the OR calculated by herd (table 3a), can be conclude that in herd A there is 2,15 more probability of finding a positive animal compared with the general mean found for EBL (OR 2,15); similarly, for herd B, I and L, OR

3,42, 2,3 and 4,5 were found, respectively, being in turn the herds that showed the highest seropositivity (> 40%), and those that were more associated with the factors related to the seropositivity for EBL (table 2a). In like manner, herds D, E, F, G, M and N showed the lowest EBL seropositivity (< 20%), with herd G being the only one in which none of the animals evaluated showed antibody titers against EBL. The differences found in this study in the levels of seropositivity between herds give an idea of the differential management regarding biosecurity in each of the production systems and the possible factors associated with seropositivity. Some of these include the use of surgical material and needles without being disinfected, and palpation gloves with various uses, among others aspects that, although were not significant factors in this study, can be important elements to consider in practice.

Additionally, an analysis by regions in which an EBL seropositivity of 33,43% was found for region 1, comprised the herds of the departments of Antioquia, Caldas and Risaralda, an area where this creole breed initially established, while in region 2 the production systems of the BON breed have been spreading, and is comprised of herds located in the departments of Meta, Tolima and Cundinamarca, showing a value of 12,98%. The question remains whether in region 2 there is a lower seroprevalence to EBL in all breeds, or if there is any resistance factor of BON cattle to infection with EBL. The higher positivity in region 1 compared with region 2 may be because some herds in region 1 breed pure BON animals together with animals of specialized breeds such as Holstein, which, as mentioned above, have a high prevalence for this virus. Another reason can be found

in the fact that some herds in region 1 reported having had positive animals for the virus before carrying out this study; that is, there was a history of the presence of EBL in the herds of this region, an aspect that is considered a factor associated with seropositivity. After analyzing the OR with respect to the overall mean for EBL in the 2 regions (table 3a), a value of 1,35 was found for region 1; that is, after making a serological evaluation it was found that there is 1,35 times more probability that the value of the seropositivity of herds in region 1 is above the overall average calculated for EBL.

Regarding the factors positively associated with seropositivity against the EBL virus, for the herd factor, having had cases of the disease increased the risk of the presence of the virus in the herd (OR 5.17). After analyzing herds A, B, I and L (figure 1b), was found that the 2 herds with the highest seropositivity (ie, B and L) stated that they had previously diagnosed the disease in the herd, which would indicate that the virus was already circulating between animals. This result would support the fact of having found a higher seroprevalence in these herds. In this sense, Kobayashi *et al.* (2014) and Nekouei *et al.* (2015) also reported having a clinical history of the disease in the herd as a factor associated with seropositivity for EBL.

Conversely, considering the second factor, using semen from bulls free of the EBL disease has been reported in studies carried out in Canada and Turkey in dairy cattle, that contact with animals from other herds is considered an important element for virus transmission (Nekouei *et al.* 2015; Murat & Bar 2015). Herds I and L reported using semen from bulls not tested to be free for the virus, which

could be an important source of infection within these herds, and could somehow explain the high seropositivity found in them. On the other hand, although the non-serological testing of new animals entering the herd was not significant in this study, the fact that the semen used in many herds does not come from bulls proven to be free for this viral infection can also be an important exogenous source for the spread of the virus.

Regarding the analyzes for BVD, general seropositivity of 50,63% was found in BON cattle from Colombia. Other studies have reported antibody titers of 56% in dairy cattle in the savannah of Bogotá region (Parra *et al.* 1994), ie, higher than those found in our work. Furthermore, other researchers in Colombia have reported lower seroprevalences than those found in this study; for example, Buitrago *et al.* (2017) found values of 27,1% in calves from dairy herds in the savannah of Bogotá region; Peña (2011) found 46% in females from 6 farms in the microregion of Valle del Cesar, and Betancur *et al.* (2007) found 29,4% in females older than 2 years and also in bulls in the municipality of Montería. The results of this research suggest that the BVD virus is widely disseminated in the herds dedicated to breeding BON cattle, as observed in figure 2b. Nonetheless, this also suggests that control measures that limit the spread of the virus should be established in the herds.

When BVD seropositivity was discriminated by sex a seropositivity for females of 55,04% and 34,54% for males was found. Different results were stated by Nava *et al.* (2013) in dairy cattle, with 63,1% seropositivity to BVD for females, while for males they found a seropositivity of 63,6%; ie, higher values than those found in the current

study for both females and males in the BON breed. The highest value of affected females in the current study could be explained by the fact that these are the animals within the herd that undergo most potentially risky practices for virus transmission, such as those used in inseminations, palpations, and surgical interventions. However, males are also a significant source of transmission, since the virus can be transmitted by semen, and in many herds natural mating is practiced; hence, the importance of reproductive and serological checks on new animals entering the herd. These results agree with the calculated OR for males and females in table 3b.

At the herd level, an average BVD seropositivity of 52,63% was found with a range of 28,20 to 96,29% in unvaccinated BON cattle herds from Colombia, indicating that in all the registered herds there were animals with antibodies for BVD, and there was at least one herd with almost all of its animals positive (figure 2b). Lower prevalences than these were found by Buitrago *et al.* (2017), with an average value of 27,1%, but ranging from 0 to 90% in vaccinated and unvaccinated dairy herds. After analyzing the OR calculated for BVD per herd (table 3b) it was found that in herd B there is 11,04 more probability of finding a positive animal compared with the general mean found for BVD (OR 11,04). Likewise, for herd D, I and K, OR 1,51, 25,34 and 1,10 were found, respectively, being in turn, the 4 herds that showed the highest seropositivity (> 50%), and some of those were also associated with the risk factors found for BVD (table 2b).

After analyzing the seropositivities for BVD in the 2 regions, a seropositivity for region 1 of 52,81% was found, while region 2 had 44,85%, with no statistically significant difference between them. These results indicate the highest expansion of

BVD in all the regions of the country, and a considerable difficulty in herds to avoid the entry of BVD and to minimize the number of infected animals, even though in some herds there are better preventive management practices (table 3b).

Regarding the factors found in this study associated with BVD seropositivity in BON cattle herds in Colombia (table 2b), the fact of having found cases of the disease in the herd, became an important risk factor (OR 29,02). Indeed, given the virus transmission mechanisms through infected body fluids (Lanyon *et al.* 2014; Niskanen & Lindberg 2003), the presence of 1 or more infected animals in the herd could increase the risk of transmission to healthy animals. In this sense, Buitrago *et al.* (2017) found as associated factors to contract BVD a history of symptoms of the disease in calves from dairy herds in the savannah of Bogotá region. When herds A, B, D, F, H, I, and K were evaluated, which were those with seropositivity of more than 40% (figure 2b), only herd I manifested having a history of the disease, while 5 of the 7 herds stated that the placental tissues were not buried (OR 1,72), but were left for consumption by birds of prey or other animals. It should also be considered that the pathogen can be transmitted through cells or secretions infected with the virus (Rivera 2008; Rondón 2006), and that there may also be contagion from healthy animals through any material that has been in contact with body fluids from infected animals (Niskanen & Lindberg 2003; Lanyon *et al.* 2014). At birth, if a female is infected with BVD, fetal tissues with infected cells can be moved to another site by scavenging animals, which can contribute to its spreading, increasing the likelihood of contact with healthy animals, even though the virus can persist in the

environment for short periods (OIE 2015). Another factor associated with finding high BVD seropositivity in this study was the non-performance of serological tests on new animals entering the herd (OR 1,77), which was reported in 3 out of 7 herds mentioned above. This factor has been found in some studies to be important for the entry of BVD into herds (Alves *et al.* 2016; Amelung *et al.* 2018; Talafha *et al.* 2009) since it is common to buy and sell animals among farmers without taking biosecurity measures to control the transmission of this as well as other diseases.

In general terms, it is evident that the factors associated with seropositivity for BVD (table 2b) might be some of the reasons why in these BON cattle herds the seropositivity rate is high; therefore, it is essential to implement actions to improve the biosecurity in herds.

## CONCLUSIONS

In the current research, EBL seropositivity in BON cattle in Colombia was 27,1%, while for BVD, it was 50,63%. Statistical differences for EBL were found between regions, between sexes and between herds, except for herd B. Meanwhile, for BVD there was a statistical difference between sexes and between herds, except for herd B, with higher seropositivity in females for both viral agents. Likewise, the factors associated with seropositivity in BON cattle for EBL include having presented a clinical history of the disease and not using semen from bulls negative for EBL, while for BVD the factors associated with seropositivity were having presented a history of the disease, the inadequate disposition of placental tissues after birth, and the non-performance of serological tests on animals entering the herd. Consequently,

it is vital to establish control measures in the farms considering the risk factors to limit the expansion of these viral pathogens in livestock production systems of BON cattle in Colombia.

## Consent to participate

The owners of the farms participating in the research signed a consent for their animals to be bled, and to participate in the survey designed to identify risk factors associated with seropositivity to Bovine Viral Diarrhea and Enzootic Bovine Leukemia viruses.

## Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

## Funding

This research had financing by Minciencias [contract FP44842-015- 2018], and co-financing by the Universidad Nacional de Colombia, Medellín campus, and the Universidad Tecnológica de Pereira.

## ACKNOWLEDGMENTS

Many thanks to the participating herds for supplying the information for the preparation of this work.

## REFERENCES

- Alfonso R, Almansa JE, Barrera J del C. 1998. Factores de riesgo de leucosis bovina enzoótica en la sabana de Bogotá y los valles de Ubaté y de Chinquinquirá, Colombia. *Rev sci tech Off int Epiz.* 17(3):723-732. Available on: <https://www.oie.int/en/publications-and-documentation/scientific-and-technical-review-free-access/list-of-issues/>
- Alves MA, Cunha A, Dantas SV, Duarte ML, Santos S. 2016. Risk factors associated with Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) infection in the semiarid of the state of Paraíba, in the northeast region

- of Brazil. *Semin Cienc Agrar.* 37(5):3095-3106. Doi: 10.5433/1679-0359.2016v37n5p3095
- Amelung S, Hartmann M, Haas L, Kreienbrock L. 2018. Factors associated with the bovine viral diarrhoea (BVD) status in cattle herds in Northwest Germany. *Vet Microbiol.* 216(1):212-217. Doi: 10.1016/j.vetmic.2018.01.018
- Arboleda JJ. 2003. Resistencia natural del ganado BON a la brucelosis y fiebre aftosa. En: *Contribución a la preservación y propagación del ganado criollo colombiano*, 1.<sup>th</sup> ed. Medellín: Biogénesis. pp. 93-99.
- Betancur CA, Gogorza LM, Martínez FG. 2007. Seroepidemiología de la diarrea viral bovina en Montería, Córdoba, Colombia. *Analecta Vet.* 27(2):11-15. Available on: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/11204>
- Betancur C, Rodas J. 2008. Seroprevalencia del virus de la leucosis bovina en animales con trastornos reproductivos de Montería. *Rev MVZ Córdoba.* 13(1):1197-1204. Doi: 10.2225/vol11-issue4-fulltext-2
- Buitrago SF, Gutiérrez, ID. 1999. Potencial genético y productivo del ganado Blanco Orejinegro. En: *Martínez Correal G editor. Censo y caracterización de los sistemas de producción del ganado criollo y Colombiano*. 1.<sup>th</sup> ed. Bogotá: Instituto Colombiano Agropecuario. pp. 65-73.
- Buitrago ER, Jiménez EC, Zambrano JL. 2017. Identificación de factores asociados con la exposición al virus de la diarrea viral bovina (VBVD) en terneras de hatos lecheros de la sabana de Bogotá. *Rev Med Vet.* 36(1):63-73. Doi: 10.19052/mv.5172
- Cerda J, Vera C, Rada G. 2013. Odds ratio: theoretical and practical issues. *Rev Med Chile* 141(10):1329-1335. Doi: 10.4067/s0034-98872013001000014
- Delgado I, Alfonso A. 2009. Presencia de anticuerpos al virus de la leucosis bovina en rebaños pertenecientes a las provincias occidentales y centrales de Cuba. *Rev Salud Anim.* 31(1):24-28. Available on: <http://revistas.censa.edu.co/index.php/RSA/article/view/390/352>
- Departamento Nacional de Estadística (Dane). 2017. Encuesta Nacional Agropecuaria. Boletín técnico, comunicación informativa. [Internet] [citado 2018 December 28]; available on: <https://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/agropecuario/encuesta-nacional-agropecuaria-ena>
- Hernández D, Posso AM, Benavides J, Muñoz J, Giovambattista G, Álvarez LA. 2011. Detección del virus de la Leucosis bovina en ganado criollo colombiano mediante PCR-anidado. *Acta Agron.* 60(4):312-318. Available on: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169922450038&cidp=1&cid=530002>
- Houe H. 2003. Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologicals* 31(2):137-143. Doi: 10.1016/s1045-1056(03)00030-7
- Kobayashi S, Hidano A, Tsutsui T, Yamamoto T, Hayama Y, Nishida T, Murakami K. 2014. Analysis of risk factors associated with bovine leukemia virus seropositivity within dairy and beef breeding farms in Japan. *Res Vet Sci.* 96(1):47-53. Doi: 10.1016/j.rvsc.2013.11.014
- Lanyon SR, Hill FI, Reichel MP, Brownlie J. 2014. Bovine viral diarrhoea: Pathogenesis and diagnosis. *Vet J.* 199(2):201-209. Doi:10.1016/j.tvjl.2013.07.024
- López-Herrera A, Ruiz J, Góez YP, Zapata W, Velilla PA, Arango AE, Urcuqui-Inchima S. 2009. Apoptosis as pathogenic mechanism of infection with vesicular stomatitis virus. Evidence in primary bovine fibroblast cultures. *Biocell.* 33(2):121-132. Available on: <http://www.techscience.com/biocell/v33n2/37762>
- López-Herrera A, Salazar A, Restrepo G, Zuluaga F, Ossa J. 2002. Resistencia natural, *in vitro*, a los virus de estomatitis vesicular y de rinotraqueitis infecciosa en ganado Blanco Orejinegro. *Rev Colomb Cienc Pec.* 15(1):100-106. Available on: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=295026068011>
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR). 2003. Situación de los Recursos Zoogenéticos en Colombia. Bogotá: ed. Produmédicos. 119 p. Available on: <http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/handle/11348/3952>
- Martínez G. 1992. El Ganado Criollo Colombiano Blanco Orejinegro (Bon). *Anim Genet Resour* 9(1):27-35. Doi: 10.1017/s1014233900003175
- Motta L, Waltero I, Abeledo M. 2013. Prevalencia de anticuerpos al virus de la diarrea viral bovina,

- Herpesvirus bovino 1 y Herpesvirus bovino 4 en bovinos y búfalos en el departamento de Caquetá, Colombia. *Rev Salud Anim.* 35(3):174-181. Available on: <http://revistas.censa.edu.co/index.php/RSA/article/view/332>
- Murat Ş, Bar Ö. 2015. An 8-year longitudinal sero-epidemiological study of bovine leukaemia virus (BLV) infection in dairy cattle in Turkey and analysis of risk factors associated with BLV seropositivity. *Trop Anim Health Prod.* 47(1):715-720. Doi: 10.1007/s11250-015-0783-x
- Murakami H, Yamada T, Suzuki M, Nakahara Y, Suzuki K, Sentsui H. 2011. Bovine leukemia virus integration site selection in cattle that develop leukemia. *Virus Res.* 156(1-2):107-112. Doi: 10.1016/j.virusres.2011.01.004
- Nava LZ, Bracamonte PM, Hidalgo DM, Escobar LG. 2013. Seroprevalencia de la diarrea viral bovina en rebaños lecheros de dos municipios del estado Barinas, Venezuela. *Rev Soc Venez Microbiol.* 33(2):162-168. Available on: [http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S1315-25562013000200014&script=sci\\_abstract](http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S1315-25562013000200014&script=sci_abstract)
- Nekouei O, Vanleeuwen J, Sanchez J, Kelton D, Tiwari A, Keefe G. 2015. Herd-level risk factors for infection with bovine leukemia virus in Canadian dairy herds. *Prev Vet Med.* 119(3-4):105-113. Doi: 10.1016/j.prevetmed.2015.02.025
- Niskanen R, Lindberg A. 2003. Transmission of bovine viral diarrhoea virus by unhygienic vaccination procedures, ambient air, and from contaminated pens. *Vet J.* 165(2):125-130. Doi: 10.1016/s1090-0233(02)00161-2
- Organización Mundial De Salud Animal (OIE). 2015. Diarrea viral bovina. Manual terrestre de la OIE. Available on: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/2.04.07\\_BVD.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.04.07_BVD.pdf)
- Organización Mundial De Salud Animal (OIE). 2018. Leucosis Bovina enzoótica. Manual Terrestre de la OIE 2018. Available on: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/2.04.10\\_Leucosis\\_bovina\\_enzo%C3%B3tica.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.04.10_Leucosis_bovina_enzo%C3%B3tica.pdf)
- Parra J, Vera V, Villamil L, Ramírez G. 1994. Seroepidemiología de la diarrea viral bovina en explotaciones lecheras de la sabana de Bogotá. *Rev Med Vet Zoot.* 42(1):29-44. Available on: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/remevez/article/view/48064>
- Peña CL. 2011. Estudio serológico de diarrea viral bovina en la microrregión del valle del Cesar. *AICA.* 1(1):309-312. Available on: <https://aicarevista.jimdo.com/n%C3%BAmeros/vol%C3%BAmes-1-2011/>
- R Core Team. 2017. A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: Foundation for Statistical Computing. Available on: <https://www.R-project.org/>
- Rivera GH. 2008. Evolución del conocimiento sobre la enfermedad de la diarrea viral bovina y su agente etiológico. *Rev Inv Vet Perú.* 19(1):93-112. [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1609-91172008000200001](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172008000200001)
- Romero J, Dávila G, Beita G, Dolz G. 2015. Relación entre el estado serológico a leucosis bovina enzoótica y parámetros reproductivos en hatos lecheros especializados de Costa Rica. *Agron costarric.* 39(2):7-18. Available on: <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agrocost/article/view/21767>
- Rondón I. 2006. Diarrea Viral Bovina: Pathogenesis and Immunopathology. *Rev MVZ Córdoba.* 11(1):694-704. Available on: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0122-02682006000100003](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-02682006000100003)
- Ruiz J, Ossa JE, Barrera J, Rugeles MT, López-Herrera A. 2015. Bovine Fibroblasts Response to Foot-and-Mouth Disease Virus: Influence of Integrins and Soluble Factors in Resistance. *J Vet Sci Technol.* 06(02):1-6. Doi: 10.4172/2157-7579.1000219
- Talafha AQ, Hirche SM, Ababneh MM, Al-Majali AM, Ababneh MM. 2009. Prevalence and risk factors associated with bovine viral diarrhoea virus infection in dairy herds in Jordan. *Trop Anim Health Prod.* 41(1):499-506. Doi: 10.1007/s11250-008-9214-6
- Thomann B, Tschopp A, Magouras I, Meylan M, Schüpbach G, Häsler B. 2017. Economic evaluation of the eradication program for bovine viral diarrhoea in the Swiss dairy sector. *Prev Vet Med.* 145(1):1-6. Doi: 10.1016/j.prevetmed.2017.05.020
- Úsuga C, Echeverry J, Lopez-Herrera A 2015. Diagnóstico molecular del virus de leucosis bovina

- en una población de vacas Holstein, Colombia. Arch de Zootec. 64(248):383-388. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49543393011>
- Úsuga C, Echeverri JJ, López-Herrera A. 2018. El componente racial influencia la resistencia a la infección con el virus de la leucosis bovina. Rev Med Vet Zoot. 65(2):130-139. Doi: 10.15446/rfmvz.v65n2.75632
- Vásconez HA, Sandoval VP, Puga TB, de la Cueva F. 2017. Seroprevalencia de Leucosis enzoótica bovina en animales entre 6 y 24 meses en las provincias de Manabí, Pichincha y Chimborazo, Ecuador. Lgr. 26(2):132-138. <https://www.redalyc.org/jatsRepo/4760/476052525012/html/index.html>.

### Forma de citación del artículo:

Saldarriaga-Saldarriaga A, Londoño Gil M, González-Herrera LG, Rincón Flórez JC, López-Herrera A. 2021. Seropositivity for Bovine Viral Diarrhea and Enzootic Bovine Leukemia viruses in Blanco Orejinegro cattle in Colombia and infection associated-factors. Rev Med Vet Zoot. 68(2): 105-123. <https://doi.org/10.15446/rfmvz.v68n2.98031>

## Bioconcentración de metales pesados (Zn, Hg, Pb) en tejidos de *Ariopsis felis* y *Diplodus annularis* en el río Ranchería, norte de Colombia

C. Doria Argumedo<sup>1\*</sup>

Artículo recibido: 6 de julio de 2020 - Aprobado: 26 de marzo de 2021

### RESUMEN

La contaminación por metales pesados en los ecosistemas acuáticos en el planeta es una de las más severas problemáticas que comprometen la seguridad alimentaria a nivel local, regional y global. En este estudio, se aborda el problema específico de la bioconcentración de mercurio (Hg), plomo (Pb) y Zinc (Zn) en los tejidos orgánicos de 2 de las especies de peces (*Ariopsis felis* y *Diplodus annularis*) de mayor importancia alimenticia para los pobladores riverieños del río Ranchería, al norte de Colombia. Las muestras de tejido orgánico se sometieron a una digestión ácida ( $\text{HNO}_3$  y  $\text{HClO}_4$  en relación 3:1) y la cuantificación de los metales se realizó por espectrofotometría de absorción atómica. Adicionalmente, se midieron los niveles de los metales en el sedimento, con el objeto de determinar índices de calidad medioambientales, lo que permitió determinar que los metales pesados no presentan riesgo para los organismos acuáticos que habitan en esta zona. Se encontraron diferentes valores de concentración de metales pesados: en orden decreciente,  $\text{Zn} > \text{Hg} > \text{Pb}$ , en sedimento, y  $\text{Hg} > \text{Zn} > \text{Pb}$ , en el tejido biológico. Los resultados muestran que las concentraciones de los metales pesados presentes en el tejido de los peces y en el sedimento guardan una correlación positiva y una regresión lineal estadísticamente significativa ( $p = 0,001$ ,  $p < 0,05$ ). La presencia de metales pesados en el sedimento del río y de bioconcentrados en los peces podría derivarse de fuentes puntuales y difusas relacionadas con actividades agrícolas, pecuarias, mineras y aguas residuales.

**Palabras clave:** espectrofotometría de absorción atómica, metales pesados, tejidos de peces, río Ranchería.

## Bioconcentration of heavy metals (Zn, Hg, Pb) in tissues of *Ariopsis felis* and *Diplodus annularis* in the Ranchería river, Northern Colombia

### ABSTRACT

Heavy metal pollution in aquatic ecosystems in the area is one of the most severe problems that compromise food security at the local, regional and global levels. In this study, the specific problem of the bioconcentration of mercury (Hg), lead (Pb), and Zinc (Zn) in 2 of the higher nutritional importance fish species (*Ariopsis felis* and *Diplodus annularis*) for the riverside inhabitants of the Ranchería river, in northern Colombia, is addressed. The organic tissue samples were subjected to acid digestion ( $\text{HNO}_3$  and  $\text{HClO}_4$  in a 3:1 ratio), and the quantification of metals was carried out by atomic absorption spectrophotometry. Additionally, the levels of metals in the sediment were measured, in order to determine environmental quality indices. This allow to determine that heavy metals

<sup>1</sup> Universidad de La Guajira. cdoria@uniguajira.edu.co



do not present a risk to the aquatic organisms that inhabit this area. Different heavy metal concentration values were found: in decreasing order, Zn> Hg> Pb in sediment, and Hg> Zn> Pb in biological tissue. The results reveal that the concentrations of heavy metals present in fish tissue and sediment show a positive correlation, and a statistically significant linear regression ( $p = 0,001$ ,  $p < 0,05$ ). The presence of heavy metals in river sediment and bioconcentrates in fish could derive from point and diffuse sources related to agricultural, livestock, mining and wastewater activities.

**Keywords:** atomic absorption spectrophotometry, heavy metals, fish tissues, Ranchería river.

## INTRODUCCIÓN

En el planeta, los ríos han sido desde tiempos inmemoriales los receptores directos o indirectos de los desechos líquidos y sólidos que el hombre genera (Fernández *et al.* 2004). En un principio los ríos eran capaces de soportar las cargas contaminantes que a ellos se vertían, merced a su carácter depurador. Posteriormente, al crearse grandes asentamientos urbanos, se incrementó la cantidad de los desechos vertidos y, en consecuencia, los cursos fluviales han ido perdiendo su capacidad depuradora y se han producido graves alteraciones en la calidad de sus aguas, con los subsiguientes peligros para la salud (Picazo 2007). Entre las fuentes antropogénicas de contaminación que llegan a los sistemas fluviales están los metales pesados, los cuales provienen de desechos domésticos, agrícolas e industriales, y son peligrosos para la biota acuática, el hombre y el ambiente, en general (Acosta *et al.* 2002).

Se considera que los metales pesados tienen mayor repercusión sobre los organismos acuáticos, no solo porque los afectan de manera puntual, sino también por su carácter tóxico y por su capacidad para ser acumulados en los tejidos, lo que convierte a dichos entes en bioacumuladores. En este sentido, se verían afectados todos los actores de la cadena trófica, principalmente los seres humanos, quienes son el último eslabón de la misma (Polo 2012). Los organismos concentran los metales en sus

tejidos mediante un proceso denominado *bioacumulación*, que implica el aumento progresivo de la cantidad de sustancia en los tejidos como consecuencia de que la velocidad de absorción supera la capacidad para eliminar dicha sustancia (Tah 2006). En otros términos, la bioacumulación se refiere al proceso de almacenamiento de ciertos compuestos dentro de los organismos.

En los ambientes acuáticos muchos animales, entre ellos los peces, son utilizados como especies de vigilancia debido a que tienen la capacidad de almacenar una concentración mayor de metales pesados en comparación con otras especies. Esto los convierte en un indicador importante de la contaminación y en un problema de salud humana, si son consumidos por la comunidad (Palacio 2007). El grado de acumulación de estos depende de factores tales como la naturaleza química del contaminante, el tipo de organismo, su estado fisiológico, la temperatura del agua y la salinidad (Coto 2014). Dichos metales son considerados extremadamente peligrosos para la vida dada su elevada toxicidad, incluso en bajas concentraciones (Delgado 2012), y, en comparación con otros contaminantes, no son biodegradables y sufren un ciclo ecológico global, en el cual las aguas naturales son las principales vías de acceso a los organismos. Sus efectos negativos son críticos debido a que pueden causar graves daños a nivel celular (Márquez *et al.* 2008).

Aquellas sustancias pueden ingresar en los peces mediante el contacto con la columna de agua o el sedimento, o mediante la dieta, y, adicionalmente, se pueden acumular de eslabón en eslabón a lo largo de la cadena alimenticia y, eventualmente, impactar en la salud humana (Hamza-Al-Robi 2013).

En la región de La Guajira, al norte de Colombia, la más importante fuente hídrica es el río Ranchería, al cual llegan 3 tipos principales de contaminación de origen antrópico: aguas residuales domésticas de las comunidades por las que transita, residuos de las actividades de minería de carbón a cielo abierto y escorrentía derivada de los sectores agrícola y ganadero de la región por el uso del suelo (Doria *et al.* 2017). La ictiofauna de la cuenca está compuesta en su mayoría por especies dulceacuícolas primarias y unas cuantas de origen marino que remontan el río (Mojica *et al.* 2006). Aunque la cuenca no sostiene pesquerías comerciales importantes, algunas especies, tanto dulceacuícolas como marinas, son aprovechadas para el consumo local (Ingetec 2005).

Por todo lo anterior, se llevó a cabo este proyecto, cuyo objetivo fue evaluar los niveles de bioconcentración de algunos metales pesados (Zn, Hg y Pb) en los peces *Ariopsis felis* (bagre) y *Diplodus annularis* (mojarra) —de gran importancia alimenticia para la población riverense— con el propósito de medir el impacto contaminante de dichos metales en este ecosistema acuático superficial, como resultado de las actividades humanas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Área de estudio

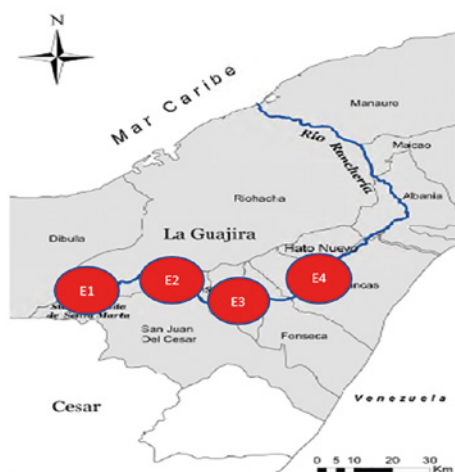
El estudio se llevó a cabo en el río Ranchería, ubicado en el departamento de

La Guajira, al norte de Colombia. Este se encuentra localizado entre los 10° 23' y 12° 28' de latitud norte y los 71° 06' y 73° 39' de longitud oeste. El río nace en la Sierra Nevada de Santa Marta, en el páramo de Chirigua, a una altitud de 3875 m s. n. m., y luego de un recorrido aproximado de 248 km desemboca en el mar Caribe en la localidad de Riohacha (Corpoguajira y UAESPNN 2011). Esta investigación fue avalada por el Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de la Guajira (acta n.º 004 de mayo de 2018).

### Campaña de muestreo

Se ubicaron en la cuenca media del río Ranchería 4 estaciones de muestreo, teniendo en cuenta la importancia para la pesca que los pobladores riverenses dan a este tramo del río (figura 1). Se recolectaron 20 ejemplares de las especies *Ariopsis felis* (bagre) y 20 de *Diplodus annularis* (mojarra), jóvenes y adultos, en las 4 estaciones de monitoreo (5 en cada estación), durante las épocas de lluvia y sequía. *Ariopsis felis* es una especie de clima subtropical, de la familia Ariidae. Los adultos pueden llegar alcanzar los 70 cm de longitud total y 5500 g de peso. Es de hábito omnívoro tipo bentófago y su dieta está basada principalmente en crustáceos decápodos, peces y detritus (Kobelkowsky y Castillo-Rivera 1995). *Diplodus annularis* es un pez de la familia de los Sparidae. En su estado adulto puede alcanzar entre los 20 y 30 cm de longitud total, vive en los fondos lodosos y se alimenta de gusanos, crustáceos, equinodermos y pequeños peces (Rodríguez-Ruiz *et al.* 2001). Adicionalmente, se tomaron 5 muestras de sedimento en cada punto para determinar índices medioambientales: índice de geoacumulación (I-geo) y factor

de bioacumulación (BFC, por sus siglas en inglés) de metales en peces.



**FIGURA 1.** Ubicación de los sitios de muestreo, cuenca del río Ranchería, Colombia  
Fuente: elaboración propia con base en Corporación Autónoma Regional de La Guajira (2012).

El I-geo fue establecido por Müller (1969), y sirve para evaluar cuantitativamente la contaminación del suelo a través de los valores presentes de metales frente a los valores de referencia. Para su cálculo se utilizó la siguiente ecuación:

$$I\text{-geo} = \text{Log}_2 \frac{C_n}{1,5 B_n} \quad (1)$$

donde  $C_n$  es la concentración de metal en la muestra,  $B_n$  es el valor de fondo y 1,5 es el factor empleado para la detección de la mínima influencia antropogénica de los suelos (Castro-González *et al.* 2019). Las categorías de interpretación del I-geo se presentan en la tabla 1.

El BCF fue calculado mediante la fórmula propuesta por Mountouris *et al.* (2002), teniendo en cuenta que la toxicidad de estos metales para los organismos acuáticos depende de la disponibilidad de

ellos en el medio y de la capacidad de los organismos para asimilar metales a partir directamente de la ingesta de partículas de sedimento:

$$BFC = C_{\text{biota}} / C_{\text{sedimento}} \quad (2)$$

donde C corresponde a la media de la concentración de cada metal en el hígado y en el riñón de los organismos analizados en cada sector de estudio, y a la media de la concentración de cada metal en el sedimento.

**TABLA 1.** Categorías de evaluación del índice de geoacumulación

Valor	Categoría
$I\text{-geo} < 0$	No contaminado
$0 < I\text{-geo} < 1$	No contaminado a moderadamente contaminado
$1 < I\text{-geo} < 2$	Moderado contaminado
$2 < I\text{-geo} < 3$	Moderada a altamente contaminado
$3 < I\text{-geo} < 4$	Altamente contaminado
$4 < I\text{-geo} < 5$	Alta a extremadamente contaminado
$I\text{-geo} \geq 5$	Extremadamente contaminado

Fuente: Müller (1969).

Las muestras de sedimento se tomaron a 5 cm de la capa superficial con una cuchara previamente desinfectada con metanol al 25%. Estas fueron transportadas al laboratorio en bolsas de polietileno previamente rotuladas y lavadas; luego, fueron secadas en bandejas plásticas a 40°C y tamizadas por una malla de nylon de 50 µm.

Los peces presentaron un tamaño (largo estándar) entre 35 y 60 cm (35,9 cm mínimo y 58,7 cm máximo) y un peso

entre 2,70 y 4,90 kg (2,76 kg mínimo y 4,83 kg máximo). Una vez obtenidas las muestras de los fragmentos de hígado y riñón, se almacenaron en bolsas plásticas, etiquetadas y selladas. En el laboratorio las muestras de los tejidos fueron conservadas a una temperatura de  $-5^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior tratamiento y análisis.

### Tratamiento de muestras de tejido de peces

Se tomaron 5 g de hígado y de riñón, y se colocaron con pinza de plástico en una cápsula de porcelana de 100 ml; luego, fueron calentados en el interior de una estufa a  $40^{\circ}\text{C}$  durante 24 h, para ser deshidratados hasta peso seco constante. Pasado el tiempo de secado, 0,5 g de muestra pulverizada fueron colocados en un vaso de precipitado de 50 ml, a ellos se adicionaron 4 ml de una mezcla ácida de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) al 65% (3 ml) y ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) al 72% (1 ml) (Ramírez 2011). El vaso de precipitado se tapó con un embudo y vidrio-reloj (sistema de reflujo) y fue sometido a calentamiento por 2 h a  $150^{\circ}\text{C}$  en una plancha de calentamiento bajo campana de extracción (Ramírez 2011). Después de enfriada, la muestra fue sometida a filtración al vacío. Finalmente, el filtrado fue recogido en un vaso de precipitado de 10 ml, transvasado a un balón volumétrico

de 25 ml, aforado con agua desionizada y almacenado en un frasco plástico debidamente rotulado (Zdanowicz *et al.* 1993).

### Tratamiento de muestras de sedimento

Aproximadamente 2 g de la muestra se depositaron en un vaso de precipitado de 50 ml, a los que se le adicionaron 10 ml de una mezcla de  $\text{HNO}_3$  al 65% y ácido clorhídrico (HCl) al 35%, en relación 6:2, para su digestión durante 2 h a temperatura ambiente, bajo campana de extracción. Después de la digestión, los extractos fueron almacenados en viales de 40 ml hasta su análisis.

### Análisis de laboratorio

Las muestras de tejido biológico y de sedimento producto de la digestión ácida se analizaron por medio de espectrofotometría de absorción atómica, usando un equipo ICE 3500 Thermo Scientific, con corrección de fondo Zeeman y lámpara de deuterio D2. Las metodologías utilizadas fueron: horno de grafito con corrección Zeeman Faas (por sus siglas en inglés) para Pb, llama Flaas (por sus siglas en inglés) para Zn y vapor frío CVAAS (por sus siglas en inglés) para Hg (Apha 2012). Los patrones se prepararon a partir de sales de alta calidad. Las condiciones de operación se indican en la tabla 2.

**TABLA 2.** Condiciones de operación para el análisis de metales por espectrofotometría de absorción atómica

Metal	Curva de Calibración	N.º de réplicas	Modo de medida	Longitud de onda (nm)	Rendija (nm)	Corrección de fondo	R	LD	LC
Pb ( $\mu\text{g/L}$ )	0,5-4,0	3	AP-T	217,0	0,2	Zeeman	0,9973	0,4	1,1
Zn (mg/L)	0,02-4,0	3	C	213,9	0,2	LD	0,9984	0,01	0,027
Hg ( $\mu\text{g/L}$ )	0,14-2,0	3	C	253,7	0,5	LD	0,9967	0,14	0,40

R = valor de regresión lineal, LD = límite de detección, LC = límite de cuantificación.

Fuente: elaboración propia con base en Universidad de La Guajira (2019).

Para la valoración de los resultados de las concentraciones de los metales se tuvieron en cuenta las Guías de Calidad Ambiental Canadiense (CEQG) compiladas por Noaa (1999) y lo establecido por la Association of American Feed Control Officials (AAFCO, 1996). A nivel de Colombia se tuvo en cuenta lo establecido por la norma Icontec 1443 (2009).

### Análisis estadístico de los datos

Para el análisis estadístico se aplicaron criterios como las pruebas de medias normales de (Anova de un factor) con varianza y medias desconocidas, el coeficiente de correlación lineal, las diferencias de concentración de metales entre los peces según las tallas y el establecimiento de correlaciones de los metales en cada matriz. Con esto, se demostró la normalidad de los datos bajo una estadística paramétrica.

Para los análisis, se utilizó el *software* SPSS, versión 21 IBM.

## RESULTADOS

### Contenido de metales pesados en el sedimento

El sedimento puede actuar como portador y posible fuente de contaminación por metales. Por modificaciones químicas que se dan en los cuerpos de agua (como cambios de pH, variación del potencial redox, contenido de oxígeno disuelto o presencia de quelatos orgánicos), los metales pesados contenidos en el sedimento pueden ser liberados a la columna de agua. Así mismo, se pueden dar movilizaciones de metales por mecanismos físicos como la agitación y removilización, tanto humana como natural (Pejman *et al.* 2015).

**TABLA 3.** Valores medios (mg/kg), de desviaciones estándar, mínimos y máximos de las concentraciones de los metales pesados en el sedimento del río Ranchería

Punto de monitoreo	Metal	Media	DE	Mínimo	Máximo
E1	Zn	12,50	5,63	5,41	14,88
	Pb	4,49	3,77	2,55	6,32
	Hg	5,34	2,58	3,76	6,95
E2	Zn	30,56	2,88	22,17	34,18
	Pb	7,07	6,03	4,73	8,19
	Hg	10,80	3,42	7,61	12,09
E3	Zn	45,07	39,72	29,78	48,37
	Pb	9,84	7,54	6,06	12,25
	Hg	13,02	6,36	5,73	18,53
E4	Zn	45,27	39,77	32,59	48,06
	Pb	11,65	10,28	8,44	17,21
	Hg	16,47	10,5	11,36	18,13

Los metales pesados entran al sedimento desde los cuerpos de agua, lo que produce un aumento progresivo, en el tiempo, de sus concentraciones y posterior bioacumulación de organismos que forman parte de esos ecosistemas (Ortiz *et al.* 2015). Los sedimentos son los más importantes reservorios de los metales o contaminantes en los sistemas acuáticos. Una exposición indirecta al sedimento contaminado tiene lugar cuando los peces consumen invertebrados bentónicos que han ingerido material particulado (Macías 2016).

En la tabla 3 se indican los valores medios, de desviaciones estándar, mínimos y máximos de las concentraciones de los metales pesados en el sedimento del río Ranchería. La matriz de correlación de Pearson, usada para medir el grado

de relación lineal entre los metales en el sedimento, se muestra en la tabla 4.

**TABLA 4.** Matriz de correlación de Pearson (R) entre los metales en el sedimento del río Ranchería

	Zn	Hg	Pb
Zn	1	0,883*	0,978*
Hg		1	0,957*
Pb			1

\*La correlación es significativa a nivel 0,01 (bilateral).

Los I-geo para los diferentes elementos metálicos presentes en el sedimento del río Ranchería se presentan en la tabla 5.

### Contenido de metales pesados en peces

En la tabla 6 se indican los valores medios, de desviaciones estándar, mínimos

**TABLA 5.** Índices de geoacumulación para metales presentes en el sedimento del río Ranchería

Metal	Concentración (µg/kg)	I-geo	Clasificación*
Zn	33,35	-8,38	No contaminado
Pb	8,26	-8,35	No contaminado
Hg	11,40	-11,48	No contaminado

\*Según Müller (1969).

**TABLA 6.** Valores medios, desviaciones estándares, mínimos y máximos, de las concentraciones de metales pesados en las 2 especies de peces del río Ranchería

Especie	Metal	Unidad de medida	Media	DE	Mínimo	Máximo
<i>Ariopsis felis</i> (bagre)	Zn	mg/kg	4,86	2,17	1,98	5,24
	Pb	µg/kg	20,66	15,44	11,09	17,69
	Hg	µg/kg	264,79	183,02	165,33	287,27
<i>Diplodus annularis</i> (mojarra)	Zn	mg/kg	3,65	1,77	1,24	5,36
	Pb	µg/kg	2,08	1,15	0,95	4,55
	Hg	µg/kg	350,38	121,72	108,93	380,04

y máximos de las concentraciones de los metales pesados en 2 especies de peces del río Ranchería.

Los valores de los factores de bioacumulación de los metales presentes en el hígado y en el riñón de las especies *Ariopsis felis* (bagre) y *Diplodus annularis* (mojarra) se presentan en la tabla 7.

**TABLA 7.** Valores de los factores de bioacumulación (BFC) de los metales presentes en el hígado y riñón de las 2 especies de peces del río Ranchería

Especie	Metal	BFC
<i>Ariopsis felis</i> (bagre)	Zn	0,14
	Pb	2,50
	Hg	23,22
<i>Diplodus annularis</i> (mojarra)	Zn	0,10
	Pb	0,25
	Hg	30,73

## DISCUSIÓN

La secuencia de concentración de los metales mostrada para el sedimento es Zn > Hg > Pb. En los sitios de muestreo las concentraciones presentan variación significativa ( $p = 0,001$ ,  $p < 0,05$ ). Las concentraciones más elevadas en las muestras tomadas en sedimento se presentaron en la estación E4 y las menores en la estación E1. A diferencia del Zn, las concentraciones de Hg y Pb no sobrepasaron el límite permisible (LP = 596  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), como seguros respecto a riesgo ecológico para metales en sedimentos establecidos por las Guías de Calidad Ambiental Canadiense (CEQG) compiladas por Noaa (1999) en la tabla de referencia rápida para inorgánicos en sedimento.

Las correlaciones significativas que se presentan entre los metales sugieren

que provienen de fuentes comunes como las actividades mineras, la utilización de agroquímicos, las actividades pecuarias y el suelo. Si se tiene en cuenta que el suelo es una mezcla de sólidos orgánicos e inorgánicos, y que sus reacciones afectan la calidad de las aguas, es fácil comprender que las características del suelo de La Guajira influyen notablemente en la composición química del agua y del sedimento de los ríos. Los suelos de La Guajira han evolucionado a partir de sedimentos moderadamente finos, bien drenados, de textura franco-arenosa, franca, franco-arcilloarenosas, francoarcillosas y arcillosas, con baja retención de humedad y pH moderadamente alcalino (7,2-8,2), atribuidos a materiales aluviales ricos en  $\text{CaCO}_3$  (Igc 2012). Según Gloval Environment Facility (2012), en la Costa Caribe de Colombia —que incluye La Guajira—, los grupos de plaguicidas de mayor uso corresponden a fungicidas (compuestos inorgánicos, ditiocarbamatos, benzimidazoles, triazoles, diazoles, diazinas, morfolinias y otros) y herbicidas (triazinas, amidas, carbamatos, dinitroanilinas, derivados de la urea, sulfonilureas, bipirilidos, hormonales del grupo fenoxi y otros). El porcentaje de utilización según los cultivos de la zona son banano con 7%; café, 5%; hortalizas, 5%; algodón, 4%; maíz, 4%; y frutales, 3%. Otras actividades que demandan el consumo de plaguicidas corresponden a los cultivos proscritos, al igual que las quemadas en las zonas destinadas para dichos cultivos.

Según la evaluación cuantitativa de la contaminación de los sedimentos por metales pesados (Müller 1999), el sedimento del río Ranchería alcanza un grado de “no contaminado”. Sobre esta clasificación es posible indicar que los metales pesados no representan riesgo para los

organismos acuáticos que habitan en esta zona. Situación similar se determinó para los sedimentos de la Bahía de Cienfuegos (Cuba), en un estudio llevado a cabo por García-Chamero *et al.* (2016), en el que los índices de geoacumulación para los metales pesados fueron evaluados como “no contaminados” o “moderadamente contaminados”, al presentar valores menores a 1. Calderón y Valdés (2012) determinan también sedimentos no contaminados por Cu, Pb y Zn en la bahía San Jorge Antofagasta (Chile) debido a índices de geoacumulación menores que 1. Valdés y Castillo (2014) indican contaminación de los sedimentos del sistema de bahías de Caldera (Chile) por Cu y Pb, con base en índices de geoacumulación con valores entre 1 y 2.

Se observa que la especie *Ariopsis felis* (bagre) presenta un índice de bioacumulación de Zn y Pb mayor que *Diplodus annularis* (mojarra), pero menor para el caso del Hg. La bioconcentración de los metales Hg, Pb y Zn en los peces puede estar asociada con las descargas municipales y agrícolas que van directamente hacia el río Ranchería. Sin embargo, también se relacionan con la lixiviación de desechos inorgánicos, descargas sólidas de residuos peligrosos y basuras domésticas que afectan a este cuerpo de agua (Cadavid-Velásquez *et al.* 2019).

De acuerdo con los resultados se tiene que existe una regresión lineal y estadísticamente significativa entre las concentraciones de los metales en el sedimento y en los peces: Zn ( $R^2 = 89,73$ ), Hg ( $R^2 = 83,18$ ), Pb ( $R^2 = 86,05$ ). Por ello, es posible afirmar que una mayor concentración de los metales en el sedimento traerá consigo una mayor concentración en el tejido de los peces. Teniendo en cuenta que Colombia no cuenta con una normativa para

los estándares de calidad ambiental para metales en tejidos animales que establezcan los valores máximos de contaminantes en entornos influenciados por acción minera u otras fuentes de metales —además de la regresión lineal—, se prefirió hacer caso de lo establecido por la Association of American Feed Control Officials (AAFCO 1996), la cual clasifica los metales en altamente tóxicos, tóxicos, moderadamente tóxicos y ligeramente tóxicos, y da unos valores máximos recomendables que son, en general, bastante elevados. Según esta referencia y teniendo en cuenta los resultados, el Hg, Pb y Zn se encuentran por debajo del nivel máximo permitido, lo que indica que las concentraciones de estos metales en los peces no ocasionarían efectos adversos biológicos en la biota animal o en los humanos. Sin embargo, a nivel nacional, se tuvieron en cuenta los niveles máximos establecidos por Icontec 1443 (2009) para pescado entero, medallones y trozos. Con ello, se observó que la concentración de Pb y Hg determinada en hígado y riñón se encuentran por debajo de lo permitido.

Las razones por las cuales el Zn se encuentra en mayor concentración que el resto de los metales considerados en el estudio, tanto en el sedimento como en los peces pueden ser: 1) por ser un metal contenido en mayores concentraciones en agroquímicos, 2) por ser un metal que lo encontramos hasta en el agua potable y 3) debido a la estructura mineralógica de la cuenca del río Ranchería. Ciertos investigadores han indicado que los organismos relacionados con el sedimento presentan concentraciones de zinc más elevadas que los organismos que habitan en la capa acuosa (Begum *et al.* 2005).

Las concentraciones de plomo en el sedimento fueron menores que las presentes



en los peces, muy a pesar de que este metal está sujeto a las variaciones geológicas naturales. El Pb, uno de los 4 metales que tienen un mayor efecto dañino sobre la salud humana, puede entrar en el cuerpo humano a través de los alimentos, el agua y el aire (Birch 2016). Este es causante de afecciones como perturbación de la biosíntesis de la hemoglobina y anemia, incremento en la presión sanguínea y daño en los riñones (Torregrosa-Espinoza *et al.* 2018).

Según los resultados, se puede decir que las concentraciones encontradas de Hg en el sedimento y en los peces, aún no son alarmantes; pero, al tener en cuenta la dinámica del río, se puede inferir que las concentraciones de este metal en el ambiente están aumentando debido a la actividad humana relacionada con la minería, la agricultura, la ganadería y el vertido de aguas residuales de los centros urbanos.

Al comparar la concentración de los metales presentes en las especies *Ariopsis felis* (bagre) y *Diplodus annularis* (mojarra) con otras especies, se encuentra que la concentración de Pb es inferior (entre 2 y 4000 veces) que en *Lutjanus stellatus* (40 µg/kg, según Leung *et al.* [2014]) y *Prochilodus magdalenae* (4760 µg/kg, según Ruiz *et al.* [1996]), pero superior, por unas 10 veces, que en *Eremophilus mutisii* (3,2 µg/kg, según Rodríguez *et al.* [2007]). El Zn se encuentra en una concentración menor que en *Cathorops spixi* (22.510 µg/kg, según Márquez *et al.* 2008) y en *Pimelodus clarias* (17.380 µg/kg, según Ruiz *et al.* [1996]). En contraste, la concentración de Hg es mucho mayor que en *Lutjanus griseus* (30 µg/kg, según Leung *et al.* [2014]) y que en *Mugil gairmaldianus* (120 µg/kg: Márquez *et al.* 2008).

De manera general teniendo en cuenta los niveles de los metales pesados presentes en los peces de este estudio con respecto a otras especies, se podría decir que la acumulación de dichos metales es dependiente de la especie y de la dinámica del ecosistema acuático; además, depende también de la intervención de actividades antropogénicas.

Los valores de los índices I-geo y BFC dan a entender que el río Ranchería presenta un enriquecimiento de metales pesados moderado, e indican la existencia de otra fuente de enriquecimiento adicional a la de la roca madre, la cual se deriva de las actividades de origen antrópico que se desarrollan a lo largo de su cuenca.

## CONCLUSIONES

Las especies *Ariopsis felis* (bagre) y *Diplodus annularis* (mojarra), y el sedimento superficial de la cuenca media del río Ranchería no presentan concentraciones elevadas de Zn, Hg y Pb. Con respecto a las normas nacional e internacionales, los niveles de los metales pesados en los sedimentos superficiales, en ninguno de los casos, sobrepasan los niveles permitidos, de tal forma que la presencia de Zn, Hg y Pb no representa riesgo para los organismos presentes en el ecosistema. El origen de los metales contaminantes que resultaron bioconcentrados en las especies de peces se atribuye a las actividades agrícolas, ganaderas y mineras. Las actividades agrícolas, principalmente, acarrear compuestos agroquímicos por medio del arrastre de aguas hacia el río. Además de las anteriores, se suman las actividades que realizan algunas personas que viven en las orillas del río como el lavado de ropa y de utensilios de cocina. Por último, se considera la aportación

de las concentraciones pseudototales que pudieran ser de origen litogénico.

### CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

### FUENTES DE FINANCIACIÓN

Este trabajo se llevó a cabo con el apoyo financiero de la Universidad de La Guajira y de Corporación Autónoma Regional de la Guajira (Corpoguajira).

### AGRADECIMIENTOS

Se expresa un sincero agradecimiento al personal del Centro de Investigación y de los laboratorios de calidad ambiental y de ciencias ambientales de la Universidad de La Guajira por el apoyo técnico proporcionado.

### REFERENCIAS

Acosta V, Lodeiros C, Senior W. 2002. Niveles de metales pesados en sedimentos superficiales en tres zonas litorales de Venezuela. *Interciencia*. 27:686-690.

Association of American Feed Control Officials (AAFCO). 1996. Official publication.

American Public Health Association (Apha), American Water Works Association (Awwa), Water Pollution Control Federation. 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22.<sup>a</sup> ed. New York: Editorial Madison S. A.

Begum A, Amin N, Kaneko S, Ohta K. 2005. Selected elemental composition of the muscle tissue of three species of fish, *Tilapia nilotica*, *Cirrhinamrigala* and *Clariusbatrachus*, from the fresh water Dhanmondi Lake in Bangladesh. *Food Chem*. 93(3):439-443.

Birch G. 2016. Determination of sediment metal background concentrations and enrichment

in marine environments: A critical review. *Sci Total Environ*. 580:813-831.

Cadavid-Velásquez E, Pérez-Vásquez N, Marrugo-Negrete J. 2019. Contaminación por metales pesados en la bahía Cispatá en Córdoba-Colombia y su bioacumulación en macromicetos. *Gest y Amb*. 22 (1): 43-53.

Calderón C, Valdés J. 2012. Contenido de metales en sedimentos y organismos bentónicos de la bahía San Jorge, Antofagasta, Chile. *Rev Biol Mar Oceanog*. 47(1):121-133.

Castro-González N, Calderón-Sánchez F, Moreno-Rojas R, Tamariz-Flores J, Reyes-Cervantes E. 2019. Nivel de contaminación de metales y arsénico en aguas residuales y suelos en la subcuenca del Alto Balsas en Tlaxcala y Puebla, México. *Rev Int Cont Ambie*. 35(2):335-348. Doi: 10.20937/RICA.2019.35.02.06

Corpoguajira, Parques Nacionales (UAESPNN). 2011. Plan de Ordenamiento de la Cuenca del río Ranchería. Diagnóstico General. Ríohacha. Colombia. Bogotá.

Coto O. 2014. Estudios de bioacumulación de un metal de interés en contaminación ambiental (plomo) en larvas de lubina de gran valor comercial [trabajo de pregrado]. [España] Universidad de Cádiz.

Delgado J. 2012. Estudio de la contaminación por metales pesados en la cuenca baja del río Guadiana [tesis de maestría]. [España] Universidad de Huelva.

Doria C, Gómez J, Marrugo J. 2017. Metales en sedimento del río Ranchería, La Guajira. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*. 15(2):64-68.

Fernández J, Ruiz F, Galán E. 2004. Clay mineral and heavy metal distributions in the lower estuary of Huelva and adjacent Atlantic shelf, SW Spain. *Sci Total Environ*. 198:181-200.

García-Chamero A, Gómez-Batista M, Alonso-Hernández C, Helguera-Pedraza Y, Chamero-Lago D, Torres-Martín A. 2016. Distribución de mercurio en la Bahía de Cienfuegos. Evaluación de *Perna viridis* (Mollusca: Bivalvia) como bioconcentrador. *Revista Cubana de Química*, 28(1):507-519.

Global Environment Facility. 2012. Reducción del Escurrimiento de Plaguicidas al Mar Caribe.

- Informe Anual. Proyecto GEF PDF-B. Bogotá. Ministerio del Medio Ambiente, PNUD y EART. Colombia.
- Hamza-Al-Robi H. 2013. Determination some Heavy metals in Sediments of Shatt Al-Hilla River by Using Modified Single Chemical Fractionation Technique. *Jubpas*. 21:2811-2818.
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (Icontec). 2009. NTC 1443. Productos de la pesca y acuicultura. Pescado entero, medallones y trozos, refrigerados o congelados. Bogotá.
- Instituto Geográfico Agustín Codazzi (Igac). 2012. Estudio Semidetallado de Suelos y Zonificación de Tierras en la Media y Baja Guajira. Escala 1:25.000. Bogotá: Imprenta Nacional.
- Ingetec S. A. 2005. Diseños de ingeniería y estudios ambientales y socioeconómicos para el proyecto de modificación del cauce del río Ranchería asociado con la expansión de la mina del Cerrejón. Contrato N.º 007- 52003. Carbones del Cerrejón LLC. Informe sobre Evaluación Ambiental Preliminar. Documento N.º RAN-2A/D2-031-RD.
- Kobelkowsky A, Castillo-Rivera M. 1995. Sistema digestivo y alimentación de los bagres (*Pisces: Ariidae*) en el Golfo de México. *Hidrobiológica*. 5(1-2):95-103.
- Leung H, Leung A, Wang H, Ma K, Liang Y, Ho K. 2014. Assessment of heavy metals/metalloid (As, Pb, Cd, Ni, Zn, Cr, Cu, Mn) concentrations in edible fish species tissue in the Pearl River Delta (PRD), China. *Mar Pollut Bull*. 78:235-245.
- Macías P. 2016. Determinación de metales pesados (Pb, Cd, Cr) en agua y sedimentos de la zona estuarina del río Tuxpan, Veracruz [tesis de maestría]. [México] Universidad de Veracruz.
- Márquez A, Senior W, Fermín I, Martínez G, Castañeda J, González A. 2008. Cuantificación de las concentraciones de metales pesados en tejidos de peces y crustáceos de la Laguna de Unare, estado Anzoátegui, Venezuela. *Rev Cient-Fac Cien V*. 8(1):41-61.
- Mojica J, Castellanos C, Sánchez P, Díaz C. 2006. Peces de la cuenca del río Ranchería, La Guajira, Colombia. *Biota Colombiana*. 7(1):129-142.
- Mountouris A, Voutsas E, Tassios D. 2002. Bioconcentration of heavy metals in aquatic environments: the importance of bioavailability. *Mar Pollut Bull*. 44:1136-1141.
- Müller G. 1969. Index of geoaccumulation in sediments of the Rhine River. *Geo Journal Library* 2:108-118.
- National Oceanic and Atmospheric Administration (Noaa). 1999. Sediment quality guidelines developed for the National Status and Trends Program. [ccma.nos. noaa.gov/publications/sqg.pdf].
- Ortiz-Romero L, Delgado-Tascón J, Pardo-Rodríguez D, Murillo-Perea E, Guio-Duque A. 2015. Determinación de metales pesados e índices de calidad en aguas y sedimentos del río Magdalena, tramo Tolima, Colombia. *Revista Tumbaga*. 2(10):43-60.
- Ossana N. 2011. Biomarcadores de contaminación acuática: estudios en los ríos Luján y Reconquista. Argentina: Universidad de Buenos Aires.
- Palacio J. 2007. Ecotoxicología acuática. 1.ª ed. Imprenta universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.
- Pejman G, Bidhendi N, Ardestani M, Saeedi M, Baghvand A. 2015. A new index for assessing heavy metals contamination in sediments: A case study. *Ecol Indic*. 58:365-373.
- Picazo I. 2007. Valorización de la raspa de uva como bioadsorbente para la eliminación de Cobre y Níquel de efluentes acuosos [trabajo de pregrado]. [España] Universidad Politécnica de Cataluña.
- Polo C. 2012. Distribución espacial de Cd y Pb en *Polymesoda solida* y sedimentos costeros del lago de Maracaibo [tesis de maestría]. [Venezuela] Universidad del Zulia.
- Ramírez O. 2011. Evaluación de la contaminación por metales pesados e hidrocarburos aromáticos policíclicos en especímenes de Lenguado Senegalés (*Solea senegalensis*). Aplicación de biomarcadores [tesis de doctorado]. [España] Universidad de Cádiz.
- Rodríguez A, González J, Suárez R. 2007. Bioacumulación por metales pesados en el Capitán de la Sabana (*Eremophilus mutisii*), habitante de la cuenca alta del río Bogotá. *Revista Electrónica de Ingeniería en Producción Acuicola*. 2: 101-115.
- Rodríguez-Ruiz S, Sánchez-Lizaso J, Ramos Esplá A. 2001. Cambios estacionales en la dieta de

- Diplodus annularis* (L., 1758) en el sudeste ibérico. Bol Inst Esp Oceanogr. 17(1-2):87-95
- Ruiz F, Fandiño C, Romero G, Guevara M. 1996. Contaminación de peces por metales pesados en el río Magdalena. Licania arbórea. 1(1):18-22.
- Tah J. 2006. Bioacumulación de metales pesados enmangle rojo (*Rizophora mangle*) [trabajo de pregrado]. [México] Universidad Quintana Roo.
- Torregrosa-Espinoza A, Martínez-Mera E, Castañeda-Valbuena D, González-Márquez L, Torres-Bejarano F. 2018. Contamination Level and Spatial Distribution of Heavy Metals in Water and Sediments of El Guájaro Reservoir, Colombia. B Environ Contam Tox. 101(1):61-67. Disponible en <https://doi.org/10.1007/s00128-018-2365-x>
- Valdés J, Castillo A. 2014. Evaluación de la calidad ambiental de los sedimentos marinos en el sistema de bahías de Caldera (27°S), Chile. Lat Am J Aquat Res. 42(3):497-513.
- Zdanowicz V, Finneran T, Kothe R. 1993. Digestion of fish tissue and atomic absorption analysis of trace elements. En: Lauenstein G, Cantillo A editores. Sampling and Analytical Methods of the National Status and Trends Program: National Benthic Surveillance and Mussel Watch Program 1984-1992. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 71. Silver Spring, MD: National Oceanic and Atmospheric Administration. pp. 31-51.

### Forma de citación del artículo:

Doria-Argumedo C. 2021. Bioconcentración de metales pesados (Zn, Hg, Pb) en tejidos de *Ariopsis felis* y *Diplodus annularis* en el río Ranchería, norte de Colombia. Rev Med Vet Zoot. 68(2):124-136. <https://doi.org/10.15446/rfmvz.v68n2.98025>

## **Análisis genético de cinco polimorfismos de nucleótido simple de caseínas lácteas obtenidos con chips genómicos en ganado Holstein de Antioquia, Colombia**

*J. Padilla-Doval<sup>1\*</sup>, J. C. Zambrano-Arteaga<sup>2</sup>, J. J. Echeverri-Zuluaga<sup>3</sup>,  
A. López-Herrera<sup>4</sup>*

*Artículo recibido: 2 de septiembre de 2020 - Aprobado: 14 de enero de 2021*

### **RESUMEN**

Los polimorfismos genéticos asociados con las caseínas de la leche son de gran importancia, ya que pueden ser usados como marcadores genéticos para mejorar el rendimiento productivo en los hatos lecheros. El objetivo de este estudio fue evaluar la diversidad y estructura genética de 5 SNP de caseínas de la leche, obtenidos con chips genómicos en vacas y toros de raza Holstein en Antioquia (Colombia). Fueron muestreados 113 animales de raza Holstein en 3 regiones del departamento de Antioquia (norte, centro y oriente) y un cuarto grupo de sementales comerciales. Los animales fueron genotipificados con chips genómicos de alta densidad (*Illumina BovineHD* e *Illumina SNP50 v2*), a partir de los cuales se identificaron 5 SNP (ARS-BFGL-NGS-8140, BTA-77380-no-rs, BTA-32346-no-rs, BTB-00821654 y ARS-BFGL-NGS-15809). Para cada SNP se realizó un análisis genético mediante un análisis de varianza molecular (amova) usando el *software* GenAIEx 6.501. Los SNP con mayor heterocigosidad total ( $H_T$ ) fueron ARS-BFGL-NGS-8140 y BTA-32346-no-rs, con resultados cercanos al 45%; sin embargo, la  $H_T$  para ARS-BFGL-NGS-15809, BTA-77380-no-rs y BTB-00821654 estuvo por debajo del 15%. El SNP con mayor diversidad genética fue BTA-32346-no-rs ( $H_o-H_e = 0,06$ ;  $p < 0,05$ ). En esta investigación se evaluó una subpoblación de toros comerciales extranjeros, en la cual se obtuvieron frecuencias alélicas y genotípicas similares a las obtenidas para las subpoblaciones locales, sugiriendo que los alelos de los toros muy posiblemente están fijados en dichas subpoblaciones, por lo que la estructura y diversidad genética tienden a ser bajas en la muestra de estudio.

**Palabras claves:** beta-caseína, kappa-caseína, producción de leche, marcador genético.

<sup>1</sup> Grupo de Investigación Navarra Medicina. Facultad de Ciencias de la Salud. Fundación Universitaria Navarra (Uninavarra). Calle 10 N.º 6-41, Neiva, Colombia. [j.padilla@uninavarra.edu.co](mailto:j.padilla@uninavarra.edu.co).

<sup>2</sup> Grupo de Investigación en Bioquímica-Estudios Genéticos (Biogen). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Nariño (Udenar). Calle 18, carrera 50-02, Ciudadela Universitaria Torobajo, San Juan de Pasto, Colombia.

<sup>3</sup> Grupo de Investigación en Biodiversidad y Genética Molecular (Biogen). Departamento de Producción Animal. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín (Unalmed). Calle 59A N.º 63-20, Núcleo El Volador, bloque 50, oficina 310, Medellín, Colombia.

<sup>4</sup> Grupo de Investigación en Biodiversidad y Genética Molecular (Biogen). Departamento de Producción Animal. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín (Unalmed). Calle 59A N.º 63-20, Núcleo El Volador, bloque 50, oficina 310, Medellín, Colombia.

## Genetic analysis of five single nucleotide polymorphisms of dairy caseins obtained with genomic chips in Holstein cattle from Antioquia, Colombia

### ABSTRACT

Genetic polymorphisms associated with milk caseins have a great importance since they can be used as genetic markers to improve productive performance in dairy herds. The main goal of the present study was to evaluate the diversity and genetic structure of 5 SNPs of milk caseins, obtained with genomic chip in Holstein cows and bulls from Antioquia (Colombia). 113 Holstein animals were sampled in 3 regions of Antioquia (north, center, and east), and a fourth group of commercial sires. Animals were genotyped with high-density SNP chips (Illumina BovineHD and Illumina SNP50 v2), from which 5 SNPs were identified (ARS-BFGL-NGS-8140, BTA-77380-no-rs, BTA-32346-no-rs, BTB-00821654 and ARS-BFGL-NGS-15809). For each SNP, a genetic analysis was performed by means of an analysis of molecular variance (AMOVA) using the GenAIEx 6.501 software. The SNPs with the highest total heterozygosity ( $H_T$ ) were ARS-BFGL-NGS-8140 and BTA-32346-no-rs, with results close to 45%; however, the  $H_T$  for ARS-BFGL-NGS-15809, BTA-77380-no-rs, and BTB-00821654 were below 15%. The SNP with the highest genetic diversity was BTA-32346-no-rs ( $H_o-H_e = 0,06$ ;  $p < 0,05$ ). In this research a subpopulation of foreign commercial bulls was evaluated, in which similar allelic and genotypic frequencies to those for local subpopulations were obtained, suggesting that the alleles of the bulls are very possibly fixed in these subpopulations, so that the structure and genetic diversity tend to be low in the study sample.

**Keywords:** Beta-casein, Kappa-casein, Milk yield, Genetic marker.

### INTRODUCCIÓN

Las caseínas son las proteínas más abundantes de la leche y representan el 80% de las proteínas lácteas (Kaskous 2020; Martien *et al.* 1994). Estas se agrupan en  $\alpha_{s1}$ -caseína ( $\alpha_{s1}$ -CN),  $\alpha_{s2}$ -caseína ( $\alpha_{s2}$ -CN),  $\beta$ -caseína ( $\beta$ -CN) y  $\kappa$ -caseína ( $\kappa$ -CN) (Broyard y Gaucheron 2015; Rehan *et al.* 2019). El perfil de caseínas de las razas bovinas especializadas en producción de leche ha sido mejorado genéticamente, lo que ha aumentado los rendimientos en productos como queso y leches ácidas. Así, la industria alimentaria obtiene el máximo beneficio cuando emplea como materia prima leche de buena calidad con valores elevados de proteína (Solarte *et al.* 2011; Wedholm *et al.* 2006).

Sin embargo, es importante considerar que el consumo de leche de vaca está

asociado con una mayor incidencia de enfermedades en humanos (Aune *et al.* 2015; Clarke y Trivedi 2014; Miluchová *et al.* 2013). Al final de la década de 1990, algunas investigaciones sugirieron que el consumo de la variante A1 de la  $\beta$ -caseína, presente en la leche de vaca, es un factor de riesgo de diabetes mellitus tipo 1, cardiopatía isquémica, síndrome de muerte súbita del lactante (Sids), aterosclerosis, autismo, esquizofrenia y alteraciones del funcionamiento neurológico (Bekuma y Galmessa 2019; Jaiswal *et al.* 2014; McLachlan 2001; Sun *et al.* 2003). Se ha determinado que la variante A1 de la  $\beta$ -caseína produce el péptido bioactivo beta-casomorfina-7 (BCM-7) mediante el proceso de digestión. Este heptapéptido atraviesa las microvellosidades intestinales

y sistémicamente conduce al desarrollo de las enfermedades mencionadas (Jaiswal *et al.* 2014; Jianqin *et al.* 2016).

En virtud de lo anterior, se resalta la importancia de realizar investigaciones encaminadas a conocer la genética de los hatos bovinos y su relación directa con la composición de las proteínas lácteas, tanto para mejorar la producción de quesos y leches ácidas, como para mejorar la calidad sanitaria de la leche que conduzca al consumo de productos lácteos inocuos para la salud humana.

Diversos estudios realizados en ganado bovino lechero demuestran la utilidad de usar marcadores genéticos para mejorar características productivas de importancia económica como una forma de ayudar en la selección de caracteres cualitativos y cuantitativos de animales de alto desempeño. Estos marcadores aportan información sobre la identificación, distinción y estimación de distancias genéticas entre poblaciones, líneas puras e híbridos (Dias *et al.* 2009).

El objetivo de esta investigación fue evaluar la diversidad y estructura genética de 5 SNP de caseínas de la leche, obtenidos con chips genómicos en vacas y toros de raza Holstein en Antioquia (Colombia).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación fue realizada en la región lechera del departamento de Antioquia, que cubre zonas de bosque muy húmedo montano bajo (bmh-mb), con una temperatura que oscila entre 12 y 18°C y un promedio anual de lluvias entre 2000 y 4000 mm/año, en una faja altimétrica de 1800 a 2800 m s. n. m. Esta investigación fue avalada por el Comité de Ética en Investigación de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, considerando

que cumple con los estándares para este tipo de investigación (número de la carta de aprobación: cemed-015, 2012).

## Extracción de ADN

La muestra incluyó 113 animales de la raza Holstein: 86 muestras de sangre provenientes de vacas y 27 muestras provenientes de semen de toros comerciales. Para el primer grupo se colectaron 5 ml de sangre periférica en tubos al vacío con Edta como anticoagulante y se almacenaron a 4°C hasta su procesamiento. Posteriormente, se realizó la extracción de ADN mediante el método DNeasy Blood & Tissue Kit. Para la extracción de ADN, a partir de semen, se compraron pajillas comerciales de 250 y 400 µl y se empleó el método QIAamp® DNA Mini Kit, Protocol 1, para la obtención del material genómico.

## Genotipificación de animales con chips de alta densidad

Las pruebas de genotipificación fueron realizadas en un laboratorio especializado de la Universidad de Milán (Italia). Para la genotipificación se usaron 2 *beadchips* de Illumina (Illumina Inc., San Diego, CA) de diferente densidad: el *beadchip* BovineHD, que contiene 777.962 marcadores, y el chip BovineSNP50 v2, con 54.609 marcadores. Con el chip SNP50 v2 fueron genotipificados 65 animales y, con el *beadchip* HD, 48. Después de aplicar el control de calidad (*call rate* > 0,90), fueron seleccionados 5 SNP comunes en los 2 *beadchips* para la realización de este estudio. La edición de los genotipos fue realizada con los programas SAS v9.1 y PLINK 1.9. Los animales genotipificados fueron muestreados en 8 municipios de 3 zonas diferentes del departamento de Antioquia (norte, centro y oriente) y

un grupo denominado extranjero, que corresponde a los toros élite provenientes de diferentes países del mundo y que son ampliamente usados en el departamento de Antioquia (tabla 1).

**TABLA 1.** Distribución de los animales genotipificados con chips de alta densidad por municipios y regiones del departamento de Antioquia

Región	Número de animales/ región	Municipio	Número de animales/municipio
Norte	32	Belmira	9
		Entrerriós	13
		San Pedro	10
Centro	27	Bello	9
		Medellín	18
		La Unión	9
Oriente	27	Marinilla	6
		Rionegro	12
Extranjero	27	Extranjero	27

Fuente: elaboración propia.

## Selección de marcadores

Los 5 SNP seleccionados para realizar el presente estudio fueron asociados con las proteínas mayoritarias de la leche ( $\alpha_{s1}$ -caseína,  $\alpha_{s2}$ -caseína,  $\beta$ -caseína y  $\kappa$ -caseína), de acuerdo con los resultados obtenidos por Schopen *et al.* (2011) y Fang *et al.* (2019) (tabla 2).

## Análisis genético

La frecuencia de los diferentes alelos  $f(A)$  y  $f(B)$  se realizó determinando la proporción de cada forma del gen entre el número de copias totales de la población en estudio. Se identificaron los homocigóticos (2 copias del mismo alelo) y los heterocigóticos (1 copia de cada alelo) y se calculó la frecuencia  $F$  de cada alelo contando los homocigóticos y añadiendo la mitad de los heterocigóticos, según el método descrito por Hartl (2000).

A partir de las frecuencias alélicas  $f(A)$  y  $f(B)$  y genotípicas  $f(AA)$ ,  $f(AB)$  y  $f(BB)$  de los 5 SNP, se determinó la deficiencia o exceso de heterocigotos para el locus en cada población y para la población total con la prueba exacta de Hardy Weinberg (HW), según Guo y Thompson (1992). La diversidad genética se determinó mediante la comparación de la heterocigosidad

**TABLA 2.** SNP seleccionados para el análisis genético en el presente estudio

SNP	Cromosoma	Posición/ cromosoma	Proteína asociada	Variación	Ensamble	Referencia
ARS-BFGL-NGS-8140	1	149.189.841	$\alpha_{s2}$ -CN	[A/G]	BTAU4.0	Fang <i>et al.</i> (2019);
BTA-32346-no-rs	13	38.193.375	$\alpha_{s1}$ -CN	[T/G]	BTAU4.0	Liu <i>et al.</i> (2009);
BTA-77380-no-rs	6	95.988.438	$\beta$ -CN	[A/G]	BTAU4.0	Schopen <i>et al.</i> (2011)
BTB-00821654	21	47.056.558	$\kappa$ -CN	[A/G]	BTAU4.0	
ARS-BFGL-NGS-15809	22	52.343.527	$\alpha_{s1}$ -CN	[T/C]	BTAU4.0	

Fuente: elaboración propia con base en las fuentes mencionadas en la tabla.



observada ( $H_o$ ) y la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) entre las poblaciones para los 5 SNP seleccionados (Guo y Thompson 1992). La estructura genética se calculó mediante los estadísticos F de Wright:  $F_{IT}$ , que corresponde a la endogamia global;  $F_{IS}$ , que mide la subdivisión intrapoblacional; y el  $F_{ST}$ , que mide la subdivisión poblacional (Wright 1969). Esta se calculó tanto para la población global como para las subpoblaciones, utilizando para esto, el análisis de varianza molecular (amova), que permite analizar la variación entre, y dentro de, poblaciones con su respectiva significancia estadística, bajo la hipótesis nula de que los alelos o genotipos tienen la misma distribución en todas las subpoblaciones. También se determinó el flujo génico ( $Nm$ ) como lo describe Provine (2001).

Todos los análisis de frecuencias alélicas y genotípicas, estructura genética y diversidad genética fueron realizados usando el programa GenAIEx 6.501 (Peakall y Smouse 2012).

**RESULTADOS**

Los alelos A y B para los SNP BTA-32346-no-rs y ARS-BFGL-NGS-15809 presentan una frecuencia alélica muy diferente en cuanto a la población global y las subpoblaciones (tabla 3). Para los alelos A y B del SNP BTA-77380-no-rs en la población global, las frecuencias fueron 0,08 y 0,92, respectivamente; mientras que para el SNP BTB-00821654 en la población global para los alelos A y B fueron 0,05 y 0,95.

Las frecuencias genotípicas mostraron que el genotipo de mayor ocurrencia en

**TABLA 3.** Frecuencias alélicas de 5 SNP en 3 subpoblaciones del departamento de Antioquia y 1 subpoblación de toros extranjeros

SNP	Alelo	Centro	Extranjero	Norte	Oriente	Población global
ARS-BFGL-NGS-8140	N	25	20	31	27	103
	A	0,60	0,55	0,68	0,69	0,63
	B	0,40	0,45	0,32	0,32	0,37
BTA-32346-no-rs	N	27	27	32	27	113
	A	0,56	0,70	0,67	0,70	0,66
	B	0,44	0,29	0,33	0,29	0,34
ARS-BFGL-NGS-15809	N	27	27	32	27	113
	A	0,02	0,09	0,14	0,02	0,07
	B	0,98	0,91	0,86	0,98	0,93
BTA-77380-no-rs	N	25	27	31	27	110
	A	0,08	0,07	0,11	0,04	0,08
	B	0,92	0,93	0,89	0,96	0,92
BTB-00821654	N	27	27	32	27	113
	A	0,04	0,04	0,05	0,07	0,05
	B	0,96	0,96	0,95	0,93	0,95

N: tamaño de la muestra.  
Fuente: elaboración propia.

la población global es el BB y el de menor frecuencia es el AA en los SNP ARS-BFGL-NGS-15809, BTA-77380-no-rs y BTB-00821654, mientras que el genotipo más frecuente en los SNP ARS-BFGL-NGS-8140 y BTA-32346-no-rs es el AB. La frecuencia del genotipo AB para el SNP ARS-BFGL-NGS-8140 en la población global fue 0,48, que corresponde a una mayor cantidad de animales heterocigotos en la población. Por último, para el SNP

BTB-00821654, el genotipo predominante en la población global fue el BB, con una frecuencia genotípica de 0,91 (tabla 4).

En el análisis genético para los 5 SNP, se determinó que la mayoría de las subpoblaciones se encuentra en equilibrio de Hardy Weinberg ( $p > 0,05$ ), a excepción de las subpoblaciones norte y oriente, específicamente para las regiones BTA-32346-no-rs y BTB-00821654, respectivamente ( $p \leq 0,05$ ) (tabla 5).

**TABLA 4.** Frecuencias genotípicas de 5 SNP de 3 subpoblaciones del departamento de Antioquia y una subpoblación de toros extranjeros

SNP	Genotipo	N	Centro	N	Extranjero	N	Norte	N	Oriente	N Total	Población global
ARS-BFGL-NGS-8140	AA	11	0,44	6	0,30	13	0,42	11	0,41	103	0,40
	AB	8	0,32	10	0,50	16	0,52	15	0,56		0,48
	BB	6	0,24	4	0,20	2	0,06	1	0,04		0,13
BTA-32346-no-rs	AA	8	0,30	13	0,48	12	0,38	13	0,48	113	0,41
	AB	14	0,52	12	0,44	19	0,59	12	0,44		0,50
	BB	5	0,19	2	0,07	1	0,03	2	0,07		0,09
ARS-BFGL-NGS-15809	AA	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	113	0,00
	AB	1	0,04	5	0,19	9	0,28	1	0,04		0,14
	BB	26	0,96	22	0,81	23	0,72	26	0,96		0,86
BTA-77380-no-rs	AA	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	110	0,00
	AB	4	0,16	4	0,15	7	0,23	2	0,07		0,15
	BB	21	0,84	23	0,85	24	0,77	25	0,93		0,85
BTB-00821654	AA	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,04	113	0,01
	AB	2	0,07	2	0,07	3	0,09	2	0,07		0,08
	BB	25	0,93	25	0,93	29	0,91	24	0,89		0,91

N: tamaño de la muestra.

Fuente: elaboración propia.

**TABLA 5.** Prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg para 5 SNP de 3 subpoblaciones del departamento de Antioquia y 1 subpoblación de toros extranjeros

SNP	Subpoblaciones	$\chi^2$	p-valor
ARS-BFGL-NGS-8140	Centro	2,78	0,09
	Extranjero	0,00	0,96
	Norte	1,02	0,31
	Oriente	2,24	0,14
BTA-32346-no-rs	Centro	0,07	0,79
	Extranjero	0,12	0,73
	Norte*	3,85	0,05
	Oriente	0,12	0,73
ARS-BFGL-NGS-15809	Centro	0,01	0,92
	Extranjero	0,28	0,59
	Norte	0,86	0,36
	Oriente	0,01	0,92
BTA-77380-no-rs	Centro	0,18	0,66
	Extranjero	0,17	0,68
	Norte	0,50	0,48
	Oriente	0,04	0,84
BTB-00821654	Centro	0,04	0,84
	Extranjero	0,04	0,84
	Norte	0,08	0,78
	Oriente*	5,71	0,02

Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) tabulado para 1 grado de libertad = 3,8415. \*Significativo:  $p \leq 0,05$ .

Fuente: elaboración propia.

La heterocigosidad observada ( $H_O$ ) y esperada ( $H_e$ ) mostraron valores similares para cada SNP, excepto para BTA-32346-no-rs, en el que los valores de  $H_O$  y  $H_e$  fueron significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) (tabla 6). En cuanto a la heterocigosidad total ( $H_T$ ), se tiene que es alta para los SNP ARS-BFGL-NGS-8140 y BTA-32346-no-rs, con valores de 0,47 y 0,45, respectivamente. Esto indica que

el número de individuos heterocigotos en las subpoblaciones estudiadas es alto. Además, estos 2 SNP presentan un número efectivo alto de alelos (1,86 y 1,79, respectivamente). Para los 3 SNP restantes ARS-BFGL-NGS-15809, BTA-77380-no-rs y BTB-00821654, las heterocigosidades son bajas (0,13, 0,14 y 0,09 respectivamente, al igual que el número efectivo de alelos (1,15, 1,17 y 1,10, respectivamente).

**TABLA 6.** Heterocigosidades para 5 SNP de 3 subpoblaciones del departamento de Antioquia y una subpoblación de toros extranjeros

SNP	N	Ne	H <sub>o</sub>	He	H <sub>T</sub>
ARS-BFGL-NGS-8140	103	1,86	0,47	0,46	0,47
BTA-32346-no-rs	113	1,79	0,50	0,44*	0,45
ARS-BFGL-NGS-15809	113	1,15	0,14	0,12	0,13
BTA-77380-no-rs	110	1,17	0,15	0,14	0,14
BTB-00821654	113	1,10	0,08	0,09	0,09

N: tamaño de la muestra, Ne: número efectivo de alelos, H<sub>o</sub>: heterocigosidad observada, He: heterocigosidad esperada, H<sub>T</sub>: heterocigosidad total. \*Significancia estadística:  $p \leq 0,05$ .

Fuente: elaboración propia.

**Tabla 7.** Estadísticos F de Wright para 5 SNP de 3 subpoblaciones del departamento de Antioquia y una subpoblación de toros extranjeros

SNP	N	Nm	F <sub>IS</sub>	F <sub>IT</sub>	F <sub>ST</sub>	%VAR
ARS-BFGL-NGS-8140	103	124,80	-0,021	-0,023	-0,002	0,0%
BTA-32346-no-rs	113	41,40	-0,123	-0,117	0,006	0,1%
ARS-BFGL-NGS-15809	113	5,80	-0,106	-0,061	0,041*	4,0%
BTA-77380-no-rs	110	83,10	-0,077	-0,080	-0,003	0,0%
BTB-00821654	113	17,60	0,153	0,141	-0,014	0,0%

N: tamaño de la muestra, Nm: flujo génico, %VAR: porcentaje de variación entre poblaciones. \*Significativo:  $p \leq 0,05$ .

Fuente: elaboración propia.

Finalmente, según el estadístico F<sub>ST</sub>, la población global posee una baja estructura genética, como se puede observar en la tabla 7, con valores que oscilan entre -0,002 y 0,041, a pesar de que se evaluó una subpoblación de toros extranjeros.

## DISCUSIÓN

En la selección genética, muchas frecuencias alélicas y genotípicas cambian significativamente, alterando la estructura genética de las poblaciones, hasta el punto de que algunas variantes se fijan en la población, mientras que otras desaparecen en un tiempo menor al que lo harían en condiciones naturales (Melka y Schenkel 2012). Entre los genes que más han mos-

trado cambios en sus frecuencias alélicas en las razas bovinas se encuentran los que expresan las caseínas de la leche (CSN1S1, CSN1S2, CSN3 y CSN2), los cuales codifican para  $\alpha_{S1}$ -caseína,  $\alpha_{S2}$ -caseína,  $\kappa$ -caseína y  $\beta$ -caseína, respectivamente. La  $\beta$ -caseína forma parte del *pool* de caseínas de la leche y se conocen 13 variantes proteicas codificadas por el gen CSN2; por ello, es el más polimórfico entre los genes que codifican proteínas lácteas. Las variantes más comunes en ganado Holstein para la  $\beta$ -caseína son A1 y A2. La frecuencia del alelo A1 en diferentes razas varía entre 0,06, en la raza Guernsey; 0,3-0,4, en la raza Holstein; y 0,72, en Danish Red (Kamiński *et al.* 2007). Solarte *et al.* (2011) encontraron un valor de 0,12 en

un hato colombiano de raza Holstein para el alelo A1. En un estudio realizado por Ramesha *et al.* (2016), se encontró una frecuencia para el alelo A1 de 0,169 en la raza Holstein, también más baja que la reportada por Kamiński *et al.* (2007). Esto se debe muy posiblemente a que los toros sementales usados en la actualidad son genotificados para este gen, por lo que se conocen sus formas alélicas; los toros seleccionados son aquellos con la forma alélica tipo A2 (Ramesha *et al.* 2016). En la presente investigación se analizó el SNP BTA-77380-no-rs asociado a  $\beta$ -caseína como lo reportan Schopen *et al.* (2011) y se determinó una frecuencia alélica, para el alelo A, de 0,08 y una de 0,92 para el alelo B. Este SNP está igualmente ubicado en el cromosoma 6, cercano al gen CSN2 que codifica para  $\beta$ -caseína (BTA6, posición 85449173-85457867), por lo que se sugiere que presenta frecuencias alélicas para los alelos A/B, cercanas a las variantes alélicas A1/A2 del gen CSN2 y se asume desequilibrio de ligamiento.

Es importante tener en cuenta que el consumo de leche tipo A1 (con presencia de  $\beta$ -caseína A1) está asociado a varias enfermedades en humanos (Jianqin *et al.* 2016; Kaskous 2020; Küllenberg *et al.* 2019; Laugesen y Elliott 2003). Por su parte, la forma A2 de la  $\beta$ -caseína ha sido asociada a disminución de colesterol total y disminución de la concentración de cLDL, las cuales forman un rol importante en la prevención de un amplio rango de enfermedades vasculares en humanos (Hanusová *et al.* 2010; Kamiński *et al.* 2007). Por lo anterior, es beneficioso que la frecuencia de la  $\beta$ -caseína A2 se incremente en la población (Kaskous 2020).

La  $\kappa$ -caseína, por otro lado, juega un papel clave en la formación, estabilización y agregación de las micelas de caseínas

de la leche, un aspecto importante en la industria quesera. En este sentido, los polimorfismos del gen CSN3 han sido usados en la selección asistida por marcadores moleculares para mejorar las características de la leche requerida en la producción de queso (Alipanah *et al.* 2007). Por ejemplo, el alelo B del gen CSN3 (cromosoma 6, posición 85645780-85658911), se asocia con resistencia térmica, menor tiempo de coagulación, micelas de diferentes tamaños, mejores cuajadas (Azevedo *et al.* 2008), mayor producción de proteínas y mayor producción de quesos (Patel *et al.* 2007). Garcia *et al.* (2009), reportaron una frecuencia de 0,173 para el alelo B, similar a la reportada por Ashraf *et al.* (2016), quienes obtuvieron una frecuencia de 0,20 para el mismo alelo. En este sentido, la frecuencia del alelo A es en promedio 4 veces mayor, considerando que el objetivo de la selección genética en la raza Holstein en muchos países, ha sido aumentar volúmenes de leche, más que mejorar las características composicionales de la misma, contrario a lo que sucede en otras razas como la Jersey (Ren *et al.* 2011; Zepeda *et al.* 2015).

Al evaluar la frecuencia alélica para el SNP BTB-00821654 en esta investigación, se obtuvo una frecuencia baja para el alelo A, de 0,05, por lo que se sugiere que es un alelo con tendencia a desaparecer por deriva genética. Posiblemente, este polimorfismo se asocie a los cambios realizados para mejorar los rendimientos en la composición de las proteínas lácteas, en este caso para  $\kappa$ -caseína, como lo evidenciaron Schopen *et al.* (2011).

Por otro lado, la leche que contiene una mayor proporción de las isoformas  $\alpha_{s1}$ -caseína y  $\alpha_{s2}$ -caseína con menor grado de fosforilación posee mejores propiedades de coagulación para hidrolizar

dichas isoformas más eficientemente por quimosina durante la elaboración de queso (Bijl *et al.* 2014). Además, las concentraciones de las isoformas de  $\alpha_{s1}$ -caseína y  $\alpha_{s2}$ -caseína en la leche varían considerablemente entre las vacas, por lo que es de gran interés evaluar la variación genética de las isoformas de  $\alpha_{s1}$ -caseína y  $\alpha_{s2}$ -caseína (Fang *et al.* 2017).

En una investigación realizada por Solarte *et al.* (2011), se determinó que la frecuencia para el alelo A de  $\alpha_{s2}$ -caseína presentó un valor de 0,99, lo que indica que este alelo está fijado en la población estudiada. En la presente investigación, la frecuencia para el alelo A del SNP ARS-BFGL-NGS-8140, asociado a  $\alpha_{s2}$ -caseína (Fang *et al.* 2017), fue de 0,63, indicando igualmente que está fijado en la población.

Por otra parte, en este estudio fueron determinadas la  $H_o$  y la  $H_e$ . Para el SNP BTA-32346-no-rs, asociado a  $\alpha_{s1}$ -caseína, se determinó un valor de  $H_o$  de 0,50 y de  $H_e$  de 0,44, valores que son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Esto indica que hay diversidad genética entre las subpoblaciones para dicho polimorfismo. Además, la frecuencia de genotipos AB es alta y, por lo tanto, el número efectivo de alelos ( $N_e$ ) tiende a ser cercano a 2 ( $N_e = 1,79$ ). En un estudio realizado por Solarte *et al.* (2011), en una población de ganado Holstein colombiano, se determinó un valor de  $H_e$  de 0,40 y de  $H_o$  de 0,38 para el gen  $\alpha_{s1}$ -caseína (cromosoma 6, posición 85411601-85429256), resultado similar al obtenido para la presente investigación para los 2 polimorfismos evaluados. Por otra parte, los valores de  $H_o$  y  $H_e$  para el SNP BTA-77380-no-rs, asociado al gen de  $\beta$ -caseína, fueron 0,15 y 0,14. Estos resultados son similares a los reportados por Solarte *et al.* (2011), quienes determinaron valores de  $H_o$  de 0,21 y de  $H_e$  de 0,16.

Para los SNP ARS-BFGL-NGS-15809, asociado a  $\alpha_{s1}$ -CN; BTA-77380-no-rs, asociado a  $\beta$ -CN; y BTB-00821654, asociado a  $\kappa$ -CN, los valores de  $H_T$  fueron 0,13, 0,14 y 0,09, respectivamente. Se observa que son valores bajos, lo que indica una deficiencia de heterocigotos en la población estudiada para estos 3 polimorfismos, muy posiblemente como consecuencia de realizar procesos de selección animal en los hatos, puesto que los genes de caseínas están asociados directa o indirectamente con características de calidad de la leche (Mir *et al.* 2014; Zambrano *et al.* 2012). Considerando lo anterior, se sugiere que existe una pérdida de la variabilidad genética de la raza para estos polimorfismos, por la concentración de ciertas formas alélicas asociadas a un alto rendimiento en la producción de leche, y la disminución significativa de otras formas alélicas asociadas a la calidad de la proteína láctea.

Los valores de  $F_{ST}$  fueron bajos para todos los polimorfismos evaluados en esta investigación, oscilaron entre  $-0,002$  y  $0,041$ , lo que indica que la estructura genética es baja. Resultados similares fueron reportados por Echeverri *et al.* (2015), quienes determinaron un valor de  $F_{ST}$  de  $0,045$ , para el gen de  $\kappa$ -CN, indicando que la población presenta poca estructura genética para este gen, en subpoblaciones de ganado Holstein evaluadas en el departamento de Antioquia. De igual manera, el  $F_{ST}$  reportado para el gen  $\alpha_{s2}$ -CN también fue bajo ( $-0,0015$ ), lo que indica un ligero desarrollo de estructura genética para las subpoblaciones evaluadas en el departamento de Nariño (Solarte *et al.* 2011). Para todos los SNP evaluados en esta investigación, el coeficiente de diferenciación genética ( $F_{ST}$ ) fue bajo, indicando que la diferenciación genética entre las subpoblaciones evaluadas es mínima,

aun cuando se usó una subpoblación de toros extranjeros.

Es importante tener en cuenta la fuerte selección animal que ha ocurrido en los últimos 50 años en los países desarrollados, que ha mejorado características de producción y calidad de la leche e, indirectamente, ha seleccionado formas alélicas más rentables en términos económicos, tales como el gen de  $\kappa$ -CN, el cual mejora el rendimiento quesero. Incluso se han aumentado las frecuencias alélicas de genes que afectan o, por el contrario, mejoraran la salud humana, como las formas A1 o A2 del gen de  $\beta$ -CN. Estos genes han sido y serán seleccionados como herramientas altamente útiles en la selección asistida por marcadores moleculares (Olenski *et al.* 2010).

## CONCLUSIONES

Las frecuencias alélicas y genotípicas de 3 de los SNP evaluados indican que se ha fijado 1 de los alelos en todas las subpoblaciones, lo que lleva a suponer que en la población global existe un alto grado de endogamia que genera una disminución de la heterocigosidad, provocada posiblemente por factores como la selección genética a la que han sido sometidas las subpoblaciones. Esta selección desemboca en la concentración de ciertas formas alélicas, en la disminución significativa de otras y, en general, en la pérdida de la variabilidad genética, la cual ha conducido a la producción de animales más susceptibles a enfermedades infecciosas como mastitis, metritis, cojeras, entre otras, que son potenciadas por la alta demanda fisiológica y energética de las vacas durante la gestación, la lactancia y el corto periodo de recuperación.

Es importante resaltar que en esta investigación se usó una subpoblación de

toros extranjeros con frecuencias alélicas y genotípicas similares con respecto a las subpoblaciones definidas en el departamento de Antioquia. Los resultados indican que los alelos de los toros muy posiblemente están fijados en las subpoblaciones como consecuencia de la selección genética a la que ha sido sometida la raza Holstein a través de los años.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

## Fuentes de financiación

Este trabajo se llevó a cabo con el apoyo financiero del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural del Gobierno de Colombia.

## Agradecimientos

Se expresa un sincero agradecimiento a todos los propietarios de los hatos de cada municipio de la región lechera de Antioquia y a la Cooperativa Colanta por permitir la realización de este estudio.

## REFERENCIAS

- Alipanah M, Klashnikova L, Rodionov G. 2007. K-casein genotypic frequencies in Russian breed Black and Red Pied cattle. *Iran J Biotechnol.* 3:191-194.
- Ashraf A, El Araby I, El-Bayomi K, Zagloul A. 2016. Association of polymorphisms in kappa casein gene with milk traits in Holstein Friesian cattle. *Jpn J Vet Res.* 64(2):39-43.
- Aune D, Navarro DA, Chan DS, Vieira AR, Vieira R, Greenwood DC, Vatten LJ, Norat T. 2015. Dairy products, calcium, and prostate cancer risk: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Am J Clin Nutr.* 101(1):87-117. Doi: 10.3945/ajcn.113.067157.
- Azevedo AL, Nascimento CS, Steinberg RS, Carvalho MR, Peixoto MG, Teodoro RL, Verneque RS, Guimarães SE, Machado MA. 2008. Genetic

- polymorphism of the kappa-casein gene in Brazilian cattle. *Gen Mol Res.* 7(3):623-630.
- Bekuma A, Galmessa U. 2019. A1 Beta casein: Devil in the milk-A short communication. *Appro Poult Dairy & Vet Sci.* 7(1):606-608. Doi: 10.31031/APDV.2019.07.000651
- Bijl E, Valenberg H, Sikkes S, Jumelet S, Sala G, Olieman K, Hooijdonk T, Huppertz T. 2014. Chymosin induced hydrolysis of caseins: Influence of degree of phosphorylation of alpha-S1-casein and genetic variants of beta-casein. *Int Dairy J.* 39(2):215-221.
- Broyard C, Gaucheron F. 2015. Modifications of structures and functions of caseins: a scientific and technological challenge. *Dairy Sci & Technol.* 95:831-862.
- Clarke A, Trivedi M. 2014. Bovine beta casein variants: Implications to human nutrition and health. 67(3):11-17. Doi: 10.7763/IPCBBE
- Dias SA, Polaina FG, Malago W. 2009. Marcadores moleculares na bovinocultura de corte. *Redvet.* 10(2):1-16.
- Echeverri J, Saldamando C, López A. 2015. Genetic structure analysis of a Holstein cow population in Colombia. *Rev Colom Cienc Pec.* 28(1):54-63.
- Fang ZH, Bovenhuis H, van Valenberg HJ, Martin P, Huppertz T, Visker HP. 2017. Genetic parameters for  $\alpha_{s1}$ -casein and  $\alpha_{s2}$ -casein phosphorylation isoforms in Dutch Holstein Friesian. *J. Dairy Sci.* 101:1-11.
- Fang ZH, Bovenhuis H, van Valenberg HJ, Martin P, Duchemin SI, Huppertz T, Wisker MH. 2019. Genome-Wide Association study for  $\alpha_{s1}$  and  $\alpha_{s2}$ -casein phosphorylation in Dutch Holstein Friesian. *J Dairy Sci.* 102(2):1374-1385. Doi: 10.3168/jds.2018-15593
- García B, Real de Lima Y, Simoes C, Prada e Silva L, Palma F, Veiga dos Santos M. 2009. Effect of the kappa-casein gene polymorphism, breed and seasonality on physicochemical characteristics, composition and stability of bovine milk. *R Bras Zootec.* 38(12):2447-2454.
- Guo SW, Thompson EA. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics.* 48(2):361-372.
- Hanusová E, Huba J, Oravcová M, Polák P, Vrtková I. 2010. Genetic variants of beta-casein in Holstein dairy cattle in Slovakia. *Slovak J. Anim. Sci.* 43(2):63-66.
- Hartl DL. 2000. A primer of populations Genetics. 3.<sup>a</sup> ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates Inc. 221 p.
- Jaiswal KP, De S, Sarsavan A. 2014. Review on bovine beta-casein (A1, A2) gene polymorphism and their potentially hazardous on human health. *Ijpaes.* 3(1):1-12.
- Jianqin S, Leiming X, Lu X, Yelland G, Ni J, Clarke A. 2016. Effects of milk containing only A2 beta casein versus milk containing both A1 and A2 beta casein proteins on gastrointestinal physiology, symptoms of discomfort, and cognitive behavior of people with self-reported intolerance to traditional cow's milk. *Nutr J.* 15:35. Doi: 10.1186/s12937-016-0147-z
- Kamiński S, Cieslińska A, Kostyra E. 2007. Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. *J Appl Genet.* 48(3):189-198. Doi: 10.1007/BF03195213.
- Kaskous S. 2020. A1- and A2-Milk and their effect on human health. *J Food Eng Technol.* 9(1):15-21. Doi: 10.32732/jfet.2020.9.1.15.
- Küllenberg D, Lohner S, Schmucker C, Kapp P, Motschall E, Hörrlein S, Röger C, Meerpohl J. 2019. Milk A1  $\beta$ -casein and health-related outcomes in humans: a systematic review. *Nutr Rev.* 0(0):1-29. Doi: 10.1093/nutrit/nuy063
- Laugesen M, Elliott R. 2003. Ischaemic heart disease, type 1 diabetes, and cow milk A1 beta-casein. *N Z Med J.* 116(1168):U295.
- Martien AM, Groenen J, van der Poel J. 1994. Regulation of expression of milk protein genes: A review. *Livest Prod Sci.* 38(2):61-78.
- McLachlan CN. 2001. Beta-casein A1, ischaemic heart disease mortality, and other illnesses. *Med Hypotheses.* 56 (2):262-272. Doi: 10.1054/mehy.2000.1265.
- Melka MG, Schenkel FS. 2012. Analysis of genetic diversity in Brown Swiss, Jersey and Holstein populations using genome-wide single nucleotide polymorphism markers. *BMC Res Notes.* 5(1):161. Doi: 10.1186/1756-0500-5-161.
- Miluchová M, Gábor M, Trakovická A. 2013. Analysis of Slovak spotted breed for bovine beta casein A1 variant as risk factor for human health. *Acta Biochim Pol.* 60(4):799-801.
- Mir S, Ullah O, Sheikh R. 2014. Genetic polymorphism of milk protein variants and their association studies with milk yield in Sahiwal



- cattle. *Afr J Biotechnol.* 13(4):555-565. Doi: 10.5897/AJB2013.13216
- Olenski K, Kamiński S, Szyda J, Cieslinska A. 2010. Polymorphism of the beta-casein gene and its associations with breeding value for production traits of Holstein–Friesian bulls. *Livest Sci.* 131(1): 137-140. Doi: 10.1016/j.livsci.2010.02.023
- Patel RK, Chauhan JB, Singh KM, Soni KJ. 2007. Allelic Frequency of Kappa-Casein and Beta-Lactoglobulin in Indian Crossbred (*Bos taurus* × *Bos indicus*) Dairy Bulls. *Turk J Vet Anim Sci.* 31(6):399-402.
- Peakall R, Smouse P. 2012. GenALEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics.* 28(19):2537-2539.
- Provine W. 2001. The Origins of Theoretical Population Genetics [Internet]. Chicago. University of Chicago Press. [Citado 2018 mayo 13]. Disponible en: <https://press.uchicago.edu/ucp/books/book/chicago/O/bo3618372.html>.
- Ramesha KP, Akhila R, Basavaraju M, Rani A, Katakataware MA, Jeyakumar S, Varalakshmi S. 2016. Genetic variants of  $\beta$ -casein in cattle and buffalo breeding bulls in Karnataka state of India. *Indian J Biotechnol.* 15(2):178-181.
- Rehan F, Ahemad N, Gupta M. 2019. Casein nanomicelle as an emerging biomaterial—A comprehensive review. *Colloids Surf. B: Bio-interfaces.* 179:80-292. Doi: 10.1016/j.colsurf-b.2019.03.051
- Ren DX, Miao SY, Chen YL, Zou CX, Liang XW, Liu JX. 2011. Genotyping of the k-casein and  $\beta$ -lactoglobulin genes in Chinese Holstein, Jersey and water Buffalo by PCR-RFLP. *J Genet.* 90(1):1-5.
- Schopen GC, Visker MH, Koks PD, Mullaart E, van Arendonk JA, Bovenhuis H. 2011. Whole genome association study for milk protein composition in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 94(6):3148-3158. Doi: 10.3168/jds.2010-4030
- Solarte CE, Rosero CY, Eraso YM, Zambrano GL, Barrera DC, Martínez OA, Guerrón ML, Chavés FP. 2011. Polimorfismo de las fracciones caseínicas de la leche en bovinos Holstein del Trópico Alto de Nariño. *Livestock Res Rural Dev.* 23(6):1-11.
- Sun Z, Zhang Z, Wang X, Cade R, Elmir Z, Fregly M. 2003. Relation of beta-casomorphin to apnea in sudden infant death syndrome. *Peptides.* 24(6):937-943.
- Wedholm A, Larsen L, Lindmark-Månsson H, Karlsson A, Andrén A. 2006. Effect of protein composition on the cheese making properties of milk from individual dairy cows. *J Dairy Sci.* 89(9):3296-3305.
- Wright S. 1969. Evolution and Genetics of Populations: The theory of gene frequencies [Internet]. Chicago. University of Chicago Press. 2. [Citado 2018 mayo 10]. Disponible en: <https://press.uchicago.edu/ucp/books/book/chicago/E/bo5961634.html>
- Zambrano G, Eraso Y, Solarte C, Rosero C. 2012. Relationship Between Kappa Casein Genes (CSN3) and Industrial Yield in Holstein Cows in Nariño-Colombia. En: Hurley W editor. *Milk Protein.* S. l.: Intech Open. pp. 265-282. Doi: 10.5772/47818
- Zepeda JL, Alarcón B, Ruíz A, Núñez R, Ramírez R. 2015. Polymorphism of three milk protein genes in Mexican Jersey cattle. *Electron J Biotechnol.* 18(1):1-4.

### Forma de citación del artículo:

Padilla-Doval J, Zambrano-Arteaga JC, Echeverri-Zuluaga JJ, López-Herrera A. 2021. Análisis genético de cinco polimorfismos de nucleótido simple de caseínas lácteas obtenidos con chips genómicos en ganado Holstein de Antioquia, Colombia. *Rev Med Vet Zoot.* 68(2):137-149. <https://doi.org/10.15446/rfmvz.v68n2.98026>

## Calidad composicional y concentración de ácidos grasos omega-3 (alfa-linolénico) y omega-6 (linoleico) presentes en leche bovina de tres regiones naturales del Ecuador

D. C. Alvear<sup>1\*</sup>, J. D. Guerrero<sup>2</sup>, N. F. Bonifaz<sup>3</sup>, P. F. Noriega<sup>4</sup>

*Artículo recibido: 12 de octubre de 2020 - Aprobado: 1 de marzo de 2021*

### RESUMEN

La leche de vaca es un componente importante en la dieta humana y uno de sus aportes nutricionales es la fracción lipídica formada por diversos ácidos grasos, entre ellos, el ácido linoleico (AL) de familia omega-6 y el ácido alfa-linolénico (AAL) de familia omega-3, ambos constituyentes estructurales de membranas de tejidos celulares y reguladores metabólicos. Por su importancia, el objetivo de esta investigación fue determinar la concentración de ácidos grasos omega-3 (alfa-linolénico) y omega-6 (linoleico) mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), en relación con la influencia de los factores región (Costa, Sierra y Amazonía) y época (lluviosa y seca) sobre la concentración de dichos ácidos. Se trabajó con 30 centros de acopio y se recolectó según el protocolo LCL-INS-01. El análisis composicional se realizó bajo el método ISO 9622-IDF 141/2013 /LCL-PE-01 y el análisis del perfil lipídico mediante GC-MS. Los resultados obtenidos mostraron concentraciones (%) promedio de 2,72 y 0,06 para AL y AAL, respectivamente, en el perfil lipídico. En cuanto al factor región, Costa presentó 2,07%, Sierra 3,03% y Amazonía 3,06%, por lo que se evidenció alta diferencia significativa ( $p \leq 0,01$ ) para el AL, mientras que el AAL no mostró variación. En el factor época, el AL presentó 2,63% en época seca y 3,03% en época lluviosa, y el AAL 0,14 y 0,06%, respectivamente. Los resultados permitieron concluir que el factor región influye en la concentración del AL, pero no en el AAL, y el factor época no es influyente en la concentración del AL ni en la del AAL.

**Palabras clave:** ácidos grasos, leche, vacas, cromatografía.

## Compositional quality and concentration of omega-3 (alpha-linolenic) and omega-6 (linoleic) fatty acids present in bovine milk from three natural regions of Ecuador

### ABSTRACT

Cow's milk is an important component in human diet and one of its nutritional contributions is the lipid fraction formed by various fatty acids, including linoleic acid (AL)

<sup>1</sup> Ingeniería en Biotecnología de los RRNN. Universidad Politécnica Salesiana, Avenida 12 de octubre, N 2422 y Wilson, Quito, 170109, Ecuador. d.dennise.c@hotmail.com

<sup>2</sup> Ingeniería en Biotecnología de los RRNN. Universidad Politécnica Salesiana, Avenida 12 de octubre, N 2422 y Wilson, Quito, 170109, Ecuador.

<sup>3</sup> Grupo de Investigación Nunkui Wakan. Universidad Politécnica Salesiana, Avenida 12 de octubre, N 2422 y Wilson, Quito, 170109, Ecuador.

<sup>4</sup> Grupo de investigación y desarrollo en Ciencias Aplicadas a los Recursos Biológicos. Universidad Politécnica Salesiana, Avenida 12 de octubre, N 2422 y Wilson, Quito, 170109, Ecuador.

of the omega-6 family and alpha-linolenic acid (AAL) of the omega-3 family, both structural constituents of cell tissue, membranes, and metabolic regulators. Due to its importance, the purpose of this research was to determine the concentration of omega-3 (alpha-linolenic) and omega-6 (linoleic) fatty acids present in bovine milk, by gas chromatography coupled to mass spectrophotometry (GC-MS), establishing a relation between the influence of the region (Costa, Sierra and Amazonía) and the season (rainy and dry), and the concentration of these acids. 30 collection centers were analyzed and collected, according to the LCL-INS-01 protocol. The compositional analysis was carried out under the method ISO 9622-IDF 141/2013 /LCL-PE-01, and the analysis of the lipid profile was made by GC-MS. The results obtained show average concentrations (%) of 2,72 and 0,06 for AL and AAL respectively on the lipid profile. Regarding the region factor, Costa presented 2,07%, Sierra 3,03% and Amazonía 3,06%, showing significant difference ( $p \leq 0,01$ ) in AL, while the AAL showed no variation. With reference to the season factor, AL showed 2,63% in the dry season and 3,03% in the rainy season, and AAL 0,14 and 0,06% respectively. The results allowed to conclude that the region factor influences AL concentration but does not influence in AAL, and the season factor is not influential neither on AL nor on AAL concentration.

**Keywords:** fatty acids, milk, cows, chromatography.

## INTRODUCCIÓN

En Ecuador, en las últimas décadas, la producción lechera ha tenido un constante avance debido al incremento del consumo de lácteos, y a cambios en la alimentación de la población (Zambrano *et al.* 2017). Por consiguiente, es uno de los sectores económicamente más influyentes, dentro del cual se dedican aproximadamente 3.500.000 de hectáreas para su producción. La región a la que pertenecen estas hectáreas, principalmente, es Sierra (75%), la cual es seguida por la Costa y Galápagos (14%), y, finalmente, con el 11% restante, por la región Amazónica (Torres 2018).

La leche de vaca es un componente importante en la dieta humana y 2 de sus aportes nutricionales son la fracción lipídica formada por ácidos grasos saturados (AGS), monoinsaturados (AGM) y poliinsaturados (AGP) (presentes en un 70, 26 y 4% [g AG/100g AG totales], respectivamente), y la fracción proteica

(García *et al.* 2014). De acuerdo con Castro (2014) la fracción lipídica está constituida por alrededor de 400 ácidos grasos (AG) libres o unidos al glicerol. Un importante grupo de AG son los poliinsaturados, debido a que son considerados ácidos grasos esenciales (AGE). Entre ellos se encuentran el ácido linoleico (AL) de familia omega-6 y el ácido alfa-linolénico (AAL) de familia omega-3 (Siurana 2015). Tanto el AL como AAL son constituyentes estructurales de membranas de diversos tejidos celulares, precursores del ácido araquidónico —indispensable para darle rigidez a la mitocondria—, y precursores de mediadores lipídicos bioactivos; además, intervienen en la síntesis de prostaglandinas y regulan el metabolismo del colesterol, la contracción muscular y presión arterial (Badui 2011; Delage 2019).

Estos AGE son indispensables en la dieta del ser humano; sin embargo, el cuerpo carece de la enzima desaturasa

delta ( $\Delta$ ) 12 y 15 para sintetizarlos (Baidu 2011). No obstante, con límites, el organismo es capaz de convertirlos, por lo que deben obtenerse directamente de alimentos (Cabezas *et al.* 2016). Tal motivo ha generado gran interés científico en el desarrollo de estrategias que faciliten la modificación de la composición química y la concentración de la grasa láctea (García *et al.* 2014). Entre de estas estrategias, destacan la manipulación nutricional, el efecto de la raza (Hershberger 2012), la modificación del ambiente ruminal, la influencia de variantes genéticas y la influencia de estaciones y localidades (Prieto *et al.* 2016).

Para el desarrollo de dichas estrategias existen varios factores implicados en un estudio del perfil de AG en leche bovina, que incluyen raza, suplementación alimenticia, edad vacuna, etapa de lactancia, genética bovina y factor climático (Conte *et al.* 2018; Kebede 2016). Este último ha sido uno de los más influyentes, ya que la fracción grasa varía de 0,3 a 0,5% de acuerdo con la estación climática anual, lo que ocasiona cambios en la concentración grasa y en la calidad de la leche y, por tanto, en la relación de la ingesta de AG en el consumo humano (Hershberger 2012; Kebede 2016).

Por la relevancia que presentan en el cuerpo humano el AL y AAL de leche bovina, algunos investigadores han realizado estudios de la concentración y contenido de estos AGE. Por ejemplo, en Estados Unidos la Academia de Ciencias de Nueva York menciona que un exceso de AL con una deficiencia de AAL puede producir una resistencia a la insulina (Guzmán 2011). En España, Carrero *et al.* (2005) en la Revista de Nutrición Hospitalaria estudiaron los efectos cardiovasculares de los AG omega-3 en alimentos funcionales

de base láctea. En México, Martínez *et al.* (2010) llevaron a cabo el estudio del contenido de ácido linoleico conjugado (CLA) de la familia del AL en leche de ganado lechero Holstein sometido a una dieta rica en AG precursores del CLA. Por tanto, los estudios realizados han tenido como objeto obtener alimentos con mejores componentes microbeneficiosos para la salud humana (Gebreyowhans *et al.* 2019).

El objetivo de esta investigación fue determinar la calidad composicional y la concentración de ácidos grasos omega-3 (alfa-linolénico) y omega-6 (linoleico) presentes en leche bovina de 3 regiones naturales del Ecuador. Este objetivo fue logrado por medio de la caracterización de la calidad composicional de muestras provenientes de centros de acopio bajo el método espectrofotometría de infrarrojo, de la determinación del perfil lipídico mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, y del establecimiento de la influencia del factor región (Costa, Sierra y Amazonía) y del factor época (lluviosa y seca) en la región Sierra sobre la concentración de los ácidos grasos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en los Laboratorios de Ciencias de la Vida (sede Quito, Campus Girón) y en el Laboratorio de Calidad de la Leche (LCL) (Centro de apoyo Cayambe) de la Universidad Politécnica Salesiana. Se trabajó con treinta (30) centros de acopio, en su mayoría proveedores de leche de la empresa Ecuajugos-Nestlé, de las regiones Costa, Sierra y Amazonía del Ecuador. Se obtuvieron diez (10) muestras para cada región en época lluviosa y diez (10) muestras adicionales en época seca para los centros de acopio de la región Sierra.

## Factores en estudio

Se consideraron los siguientes factores: 3 regiones del Ecuador (Costa, Sierra, Amazonía) y 2 épocas (lluviosa y seca). Para el factor época, se consideró la región Sierra debido a que es en la que se produce mayor cantidad de leche, y se realizó muestreo para época lluviosa (mes de mayo) y época seca (mes de julio), según lo señalado por Cañadas (1983).

## Toma muestras de leche cruda de vaca

Para la recolección de muestras se utilizaron frascos plásticos estériles de 50 ml y 100 ml identificados y codificados como se señala en la tabla 1. La recolección se realizó según el protocolo LCL-INS-01 del *Instructivo de toma de muestras de leche* del LCL.

Para medir los parámetros de calidad de la leche (análisis composicional) se emplearon los frascos de 50 ml con conservante bronopol en tableta y se almacenó en un *cooler* con bloques de gel refrigerantes hasta el traslado al LCL. Mientras que las muestras de 100 ml (sin conservante) se emplearon en el proceso de identificación y cuantificación de AG (perfil lipídico). Estas fueron transportadas cuidadosamente en un *cooler* con bloques de gel refrigerante al Laboratorio de Ciencias de la Vida bajo cadena de frío (4 a 6°C).

## Trabajo de laboratorio

### Análisis composicional

El análisis composicional de la leche —que incluye determinación del porcentaje de grasa, de proteína, de sólidos totales y de sólidos no grasos— se realizó en los LCL con el equipo de espectrofotometría infrarroja de gama media bajo el método ISO 9622-IDF 141/2013 “Guía para la

aplicación de espectrofotometría media infrarroja para leche/LCL-PE-01”.

### Extracción de la fracción grasa

La extracción de la fracción grasa se realizó con base en el procedimiento descrito por Martínez *et al.* (2013), añadiendo ciertas modificaciones. El método se basó en una doble centrifugación, para lo cual se tomaron 50 ml de muestra en tubos Falcon con los que se procedió a la primera centrifugación a 3000 rpm, durante 10 minutos. La fracción grasa obtenida se pasó a tubos Eppendorf de 1,5 ml y se añadió una solución de cloruro de hidrógeno (ácido clorhídrico [HCl]) 1% V/V con el objetivo de regular el pH (hasta llegar a pH 4,6). La segunda centrifugación se realizó a 10.000 rpm por 10 minutos. Con este procedimiento se logró precipitar las proteínas que no eran de interés para la investigación; entre ellas se destaca la caseína, que posee la característica de precipitar y desnaturalizarse a pH de 4,6. Finalmente, la fracción grasa se depositó en tubos Eppendorf de 1,5 ml debidamente etiquetados y codificados. Las muestras procesadas en esta etapa se conservaron en congelación a -8°C hasta su análisis.

### Identificación y cuantificación de AG

La fracción grasa sufrió un proceso de derivatización química mediante metilación de los ésteres metílicos por catálisis ácida con una solución metanólica de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 1 M (Marrero 2006). Esta derivatización se realizó con 0,1 g de la fracción grasa obtenida que se depositaron en tubos de ensayo de 10 ml; luego, se añadieron 2 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M. Posteriormente, las muestras se colocaron en una estufa a 80°C durante 2 h para la volatilización de ésteres. Finalmente se dejó enfriar las muestras, se añadieron 5 ml de

**TABLA 1.** Localidades consideradas en la investigación y su codificación

N.º	Región Costa				Región Sierra				Región Amazónica			
	Cód.	Provincia	Cantón	Sector	Cód.	Provincia	Cantón	Sector	Cód.	Provincia	Cantón	Sector
1	C01	Manabí	Chone	Eloy Alfaro	S01	Carchi	Espejo	La Libertad	A01	Napo	Quijos	Papallacta
2	C02	Manabí	Chone	Convento	S02	Imbabura	Ibarra	Zuleta	A02	Napo	Quijos	Baeza
3	C03	Manabí	Pedernales	El Carmen	S03	Tungurahua	Píllaro	Guapante	A03	Napo	Quijos	Baeza
4	C04	S. D. de los Tsáchilas	Santo Domingo	Roca Fuerte	S04	Pichincha	Rumiñahui	Sangolquí	A04	Napo	Quijos	Cosanga
5	C05	S. D. de los Tsáchilas	Santo Domingo	Alluriquín	S05	Imbabura	Ibarra	Salinas	A05	Napo	Quijos	Borja
6	C06	Manabí	Montecristi	S. Omar Vera	S06	Pichincha	Mejía	El Chaupi	A06	Napo	Quijos	Borja
7	C07	Manabí	Baizar	Morenita	S07	Pichincha	Mejía	Tambillo	A07	Napo	El Chaco	Linares
8	C08	Manabí	Chone	S. Antonio	S08	Imbabura	Cotacachi	Cotacachi	A08	Napo	El Chaco	El Chaco
9	C09	S. D. de los Tsáchilas	La Concordia	Flor de Lina	S09	Pichincha	Mejía	Pedregal	A09	Morona Santiago	San Juan Bosco	San Juan
10	C10	Manabí	Pedernales	Baren	S10	Pichincha	Cayambe	Cayambe	A10	Napo	El Chaco	G. Díaz de Pineda

Cód.: Código.w  
Fuente: elaboración propia.

*Continúa*

hexano ( $C_6H_{14}$ ) y se centrifugó a 8000 rpm durante 10 minutos (Rodríguez 2017). El sobrenadante resultante se filtró en viales ámbar de 1,5 ml con filtros PVDF *membrane*, *pore size* 0,45  $\mu$ m, marca Sigma Aldrich, para evitar la obstrucción del equipo y ser analizados por el cromatógrafo de gases (Cheng *et al.* 2008).

Para obtener el perfil de AG con la concentración del AL y AAL, se empleó cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas, con el equipo marca Bruker Scion 436-GC acoplado a un espectrómetro de masas marca Bruker EVOQ (GC-MS) y una columna capilar Bruker BR-5 ms, de 30 m, 0,25 mm de diámetro, 0,25  $\mu$ m de espesor de película y con un flujo de 1 ml/min en un tiempo de estabilización de 2 min.

Condiciones programadas: temperatura de inyección en el cromatógrafo: 250°C. En la columna, temperatura inicial de 60°C hasta alcanzar los 220°C a una velocidad de 6°C/min. En el espectrómetro de masas una energía de ionización de 70 eV, energía de filamento de 40  $\mu$ A y un rango de masas de 4-400 m/z. Como fase móvil, se utilizó gas helio (1 ml/min) y como tiempo de análisis para cada muestra, 40 minutos. La identificación de AG se realizó con base en el cromatograma y tiempo de retención del estándar de AG marca Sigma Aldrich Supelco 37 Component FAME Mix.

### **Análisis estadístico**

Se realizaron 3 análisis de varianza (anova): el primero para determinar la influencia del factor región sobre la calidad composicional láctea, el segundo acerca de la influencia del factor región sobre la concentración de AG del perfil lipídico y el tercero sobre la influencia del factor época sobre la concentración de los AG de la región Sierra; todos ellos, con la

finalidad de realizar la prueba de hipótesis de las medias. La separación de medias se realizó mediante prueba de Tukey con 5% de significancia ( $p \leq 0,05$ ) para obtener un nivel de confianza de los datos del 95% y con 1% de significancia ( $p \leq 0,01$ ) para un nivel de confianza del 99%. El análisis estadístico se realizó con la ayuda del *software* Infostat V2019.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Calidad composicional de la leche de vaca**

Se analizó la calidad composicional de 10 muestras de leche cruda de cada región en estudio (Costa, Sierra y Amazonía). A partir de estos datos se obtuvo un promedio general de 3,86; 3,18; 4,67; 12,50 y 8,66 (% g/100 ml) de grasa, proteína, lactosa, sólidos totales y sólidos no grasos, respectivamente; promedios que se encuentran dentro de la normativa establecida para leche cruda del Ecuador (Inen 2012).

Los resultados obtenidos son próximos a los expuestos en el estudio realizado en Cuenca, Ecuador, por Abril *et al.* (2013) quienes obtuvieron datos de 3,50 y 3,00 (% g/100 ml) de grasa y proteína, respectivamente, en el análisis de leche bovina en diferentes localidades de la ciudad mencionada. De forma similar, datos recolectados por Cruz *et al.* (2017) en el país vecino de Colombia exponen 3,05; 2,86 y 4,11 (% g/100 ml) para grasa, proteína y lactosa.

### **Análisis composicional de la leche de vaca**

La tabla 2 muestra las significancias estadísticas obtenidas mediante el análisis de varianza, realizado con el fin de determinar la influencia de las 3 regiones estudiadas en

los parámetros de calidad (grasa, proteína total, lactosa, sólidos totales y sólidos no grasos). De acuerdo con los resultados, al no existir diferencia significativa ( $p \leq 0,05$ ), no existe influencia del factor región sobre la concentración de los diferentes parámetros de calidad. Estos resultados son contradictorios, con respecto a lo expuesto por Abril *et al.* (2013) que mencionan que la leche posee variación en los parámetros de calidad de una región a otra y, adicionalmente, Echeverri y Restrepo (2009) comprobaron que en Colombia tanto la composición como la calidad de la leche son influenciadas por las áreas geográficas y por los cambios meteorológicos.

En cuanto al parámetro grasa, esta investigación presenta datos contrarios a los mencionados por Liang *et al.* (2017), ya que establece que la composición grasa en leche se muestra afectada por factores tanto endógenos como exógenos, entre ellos la región en la que se encuentran los bovinos. Además, según McGuffey (2017), este porcentaje cambia entre estaciones y se calcula un aumento del 0,2% en grasa por cada 10°F disminuidos en la temperatura ambiental.

De modo complementario, se reportó la región Costa como aquella que posee los valores más bajos en los parámetros de calidad (grasa, proteína total, lactosa, sólidos totales y sólidos no grasos); esto, debido a que las vacas pueden sufrir estrés por calor cuando la temperatura corporal es más alta que el rango tolerado por el bovino (Conte *et al.* 2018). De igual manera, Pragna *et al.* (2017) mencionan que cuando la temperatura sube por encima de la zona de neutralidad térmica, los animales intentan mantener la temperatura corporal mediante el aumento de pérdida de calor. A su vez, esta zona de neutralidad térmica varía en función de factores de la región como la humedad ambiental, la velocidad del aire y la temperatura (McGuffey 2017). Estudios recientes afirman que la zona de neutralidad térmica que no induce cambios fisiológicos ni de comportamiento en las vacas es de 0,5 a 20°C y de 60 a 80% de humedad relativa (Herbut *et al.* 2018).

Das *et al.* (2016) y Guo *et al.* (2018) establecen que los cambios en el comportamiento de los bovinos son el incremento de la frecuencia respiratoria, temperatura

**TABLA 2.** Análisis de varianza y coeficiente de correlación de la calidad composicional de leche de vaca

Parámetros de calidad	Significancia	Costa		Sierra		Amazonía	
		$\bar{X}$ (%g/100mL)	Rango	$\bar{X}$ (%g/100 mL)	Rango	$\bar{X}$ (%g/100 mL)	Rango
Grasa	NS	3,55	A	3,90	A	4,13	A
Proteína total	NS	3,15	A	3,22	A	3,20	A
Lactosa	NS	4,49	A	4,76	A	4,78	A
Sólidos totales	NS	11,90	A	12,69	A	12,91	A
Sólidos no grasos	NS	8,40	A	8,79	A	8,78	A

NS: no significancia.



rectal y frecuencia cardiaca, y estos afectan directamente el consumo de alimento, lo que disminuye la producción de leche, el contenido graso, el contenido de proteínas, el rendimiento y la materia seca. Lo expuesto anteriormente justifica los valores resultantes de la presente investigación.

Por otra parte, en la Sierra y la Amazonía —que poseen una menor temperatura promedio anual y, en el caso de la Amazonía, una mayor humedad relativa—, se obtuvieron resultados mayores frente a la región Costa. Esto se justifica con lo mencionado por Echeverri y Restrepo (2009), quienes resaltan que al existir una menor temperatura y una mayor precipitación, mejora tanto el consumo alimenticio como el comportamiento del bovino, y esto produce efectos positivos en los parámetros de calidad de la leche. Del mismo modo Kebede (2016) expresa que a temperaturas más altas se reduce el consumo de alimento y la tasa de conversión alimenticia disminuye; por tanto, es lógico que los resultados obtenidos en la región Costa sean menores a los del resto de regiones en estudio.

### Perfil lipídico de la leche de vaca

El perfil de AG provenientes de la fracción lipídica resulta importante al determinar la calidad de la leche debido a que los AG regulan las propiedades físicas y nutricionales de esta (Herrera *et al.* 2015). Por tanto, en el perfil lipídico del presente estudio se analizaron 15 AG en cada muestra, entre ellos los de AL y AAL de específico interés, cuya identificación y contenido se muestran en la tabla 3.

El promedio de los AGS fue de 61,64% (g AG/100g AG totales) del total de los AG analizados. La información recopilada por Ortega *et al.* (2013) indica que dichos AG son los más abundantes en leche de vaca ya que alcanzan concentraciones del 70 al

75% y están relacionados con el aumento de la concentración del colesterol y de lipoproteínas de baja densidad, los mismos que repercuten en la salud humana. Los AGS del presente estudio son menores a los datos expresados bibliográficamente, lo que se asume como un resultado favorable, considerando las repercusiones mencionadas.

Por otra parte, el total de AGP fue de 2,78% lo que concuerda con los datos reportados por Gil y Ruiz (2015), los cuales mencionan que la grasa láctea es muy pobre en AGP, estos no sobrepasan el 4% del total de AG, a consecuencia del fenómeno de hidrogenación del rumen. Adicionalmente, Calvo *et al.* (2014) mencionan que este tipo de AG en la leche cruda de vaca se encuentra en porcentajes de hasta 5%.

Como se muestra en la figura 1, desde una perspectiva global, los promedios demuestran que los AG que presentaron mayor concentración son el palmítico (C16:0), el oleico (C18:1n9) y el esteárico (C18:0), lo que concuerda con lo hallado por García *et al.* (2014), quienes exponen que los ácidos palmítico y esteárico son 2 de los 3 AG más abundantes en la fracción lipídica de la leche. Por otro lado, los AG que presentaron menor concentración son el caproico (C6:0), caprílico (C8:0) y el alfa-linolénico (C18:3n3), los mismos que se encuentran debajo de los rangos establecidos por Ruano (2005), que van del 1 al 5% para C6:0, del 1 al 3% para el C8:0 y del 0,5 al 2% para el C18:3n3.

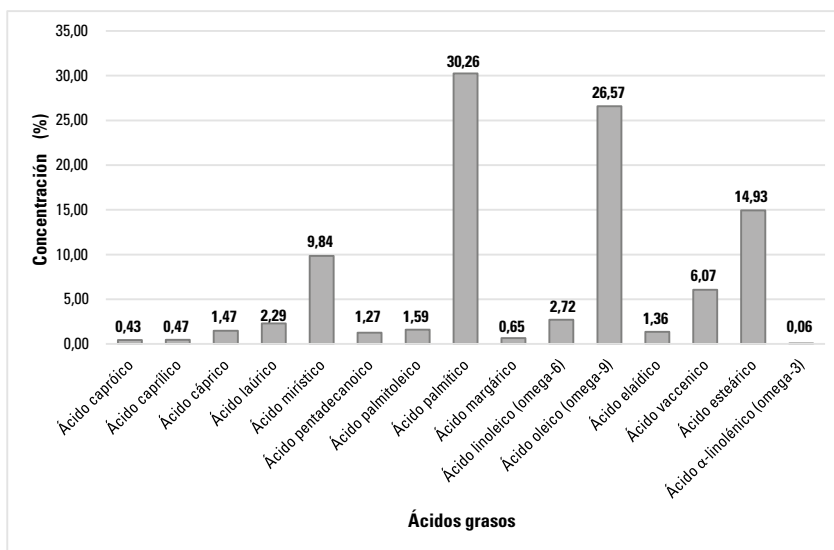
Se destacan los 2 ácidos de interés para el estudio, con promedios de 2,72 y 0,06% de AL y AAL, respectivamente. Estos resultados son similares a los expresados por Badui (2011), quienes determinan que la concentración de AL es 2,1% y de AAL 0,7%. Toyos (2011) expresa 2,2 y 1,4%

**TABLA 3.** Perfil lipídico de leche de vaca en 3 regiones del Ecuador

N. científico	Ácido hexanoico	Ácido octanoico	Ácido canoico	Ácido dodecanoico	Ácido tetradecanoico	Ácido pentadecanoico	Ácido hexadecanoico	Ácido 9-cis hexadecanoico	Ácido 9-cis octadecanoico	Ácido 9-trans octadecanoico	Ácido 11 octadecanoico	Ácido 9,12,15-cis octadecanoico	Ácido trienoico		
N. común	Ácido capríco	Ácido caprílico	Ácido capríco	Ácido láurico	Ácido mirístico	Ácido pentadecanoico	Ácido hexadecanoico	Ácido 9-cis hexadecanoico	Ácido 9-cis octadecanoico	Ácido 9-trans octadecanoico	Ácido vaccenico	Ácido esteárico	Ácido $\alpha$ -linolénico		
Fórmula	C6:0	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C15:0	C16:1	C16:0	C17:0	C18:2n6	C18:1n9	C18:1n9t	C18:3n3		
Clase	AGS	AGS	AGS	AGS	AGS	AGS	AGM	AGS	AGS	AGP	AGM	AGT	AGS	AGS	AGP
Código	Contenido (%)														
C01	0,47	0,62	1,82	2,53	11,18	1,52	1,57	30,92	0,73	1,69	26,78	1,25	5,18	13,71	0,04
C02	0,37	0,49	1,40	2,30	10,98	1,19	2,30	36,13	0,65	1,57	25,81	1,27	3,98	11,52	0,04
C03	0,29	0,46	1,47	2,14	8,91	1,24	2,05	27,36	0,65	2,86	35,48	1,17	4,30	11,60	0,02
C04	0,33	0,43	1,42	2,35	10,80	1,38	1,69	31,60	0,73	1,56	26,97	1,56	5,86	13,28	0,03
C05	0,50	0,55	1,66	2,47	11,46	1,41	1,50	33,73	0,67	1,32	25,22	1,16	4,36	13,95	0,05
C06	0,85	0,66	1,50	2,01	9,52	1,76	1,49	30,43	0,97	2,02	26,57	1,22	4,99	15,91	0,10
C07	0,51	0,46	1,28	2,01	11,08	1,58	1,59	29,92	0,74	2,39	27,54	0,15	5,97	14,69	0,10
C08	0,60	0,49	1,30	2,16	10,65	1,52	1,56	31,45	0,71	2,14	26,68	1,27	6,05	13,34	0,08
C09	0,60	0,46	1,24	1,97	9,17	1,41	1,57	31,70	0,89	3,28	27,80	0,15	5,00	14,66	0,10
C10	0,93	0,68	1,69	2,75	11,64	1,19	1,29	32,27	0,64	1,90	23,02	1,11	5,03	15,77	0,09
S01	0,43	0,65	2,29	3,53	12,03	1,35	4,26	26,88	0,59	3,26	23,99	1,36	5,43	13,89	0,07
S02	0,43	0,54	1,79	2,82	11,00	1,25	1,40	29,37	0,55	2,60	26,66	1,45	5,64	14,45	0,05

Código	Contenido (%)															
S03	0,28	0,45	1,72	2,95	10,70	1,18	4,87	30,24	0,50	4,35	24,89	1,83	4,67	11,31	0,06	
S04	0,32	0,41	1,53	2,30	10,14	1,29	1,58	30,05	0,65	3,52	26,71	1,88	7,04	12,54	0,06	
S05	0,33	0,45	1,51	2,49	10,67	1,61	1,25	30,75	0,83	2,61	23,66	1,78	7,65	14,36	0,06	
S06	0,29	0,41	1,60	2,63	10,58	1,14	1,30	28,83	0,53	3,47	25,61	1,55	6,35	15,65	0,05	
S07	0,51	0,56	1,84	2,91	9,93	0,96	1,42	29,88	0,46	3,64	28,15	1,63	4,00	14,06	0,06	
S08	0,60	0,62	1,89	2,75	10,48	1,12	1,28	33,53	0,51	2,27	24,28	1,44	5,96	13,21	0,06	
S09	0,52	0,63	2,05	3,10	11,52	1,31	1,24	29,03	0,56	2,51	25,48	1,44	6,51	14,08	0,02	
S10	0,44	0,54	1,81	2,71	11,13	1,55	1,36	29,72	0,76	2,01	27,92	0,19	5,83	13,95	0,06	
A01	0,23	0,27	0,95	2,04	8,98	0,98	1,25	28,99	0,67	2,60	28,31	1,56	5,47	17,65	0,03	
A02	0,40	0,46	1,46	2,01	9,15	1,14	1,15	29,10	0,60	3,29	25,83	1,40	7,23	16,72	0,06	
A03	0,43	0,43	1,24	2,11	8,57	1,19	1,15	28,53	0,73	2,74	27,23	1,57	6,85	17,20	0,04	
A04	0,35	0,36	1,15	1,80	8,52	1,30	0,95	27,49	0,87	2,52	26,36	1,69	7,77	18,82	0,06	
A05	0,33	0,31	0,89	1,25	6,09	1,01	1,11	30,87	0,46	3,34	27,91	1,61	7,98	16,76	0,08	
A06	0,32	0,33	1,04	1,71	8,45	1,05	1,08	30,86	0,64	2,83	26,19	1,54	6,87	17,05	0,06	
A07	0,35	0,37	1,05	1,50	7,61	1,19	1,18	30,44	0,64	3,57	26,90	1,79	7,44	15,94	0,05	
A08	0,46	0,44	1,30	1,78	7,62	1,18	1,04	27,43	0,65	3,36	27,13	1,64	7,00	18,89	0,06	
A09	0,27	0,34	1,20	1,78	8,02	1,05	1,20	28,99	0,51	3,82	27,23	1,52	7,44	16,55	0,08	
A10	0,29	0,35	1,10	1,90	8,77	1,00	1,09	31,22	0,55	2,53	24,93	1,62	8,18	16,42	0,06	
Promedio	0,43	0,47	1,47	2,29	9,84	1,27	1,59	30,26	0,65	2,72	26,57	1,36	6,07	14,93	0,06	

AGS: ácido graso saturado. AGM: ácido graso monoinsaturado. AGT: ácido graso trans. AGP: ácido graso poliinsaturado.



**FIGURA 1.** Porcentaje promedio de ácidos grasos encontrados en leche cruda de vaca de 3 regiones del Ecuador

para AL y AAL, respectivamente, mientras que un estudio en leche sueca realizado por Lindmark (2008) menciona 1,6% para AL y 0,7% para AAL.

### **Análisis de la influencia de la región sobre el perfil lipídico**

La tabla 4 expone las significancias estadísticas obtenidas del análisis de varianza realizado para determinar la influencia del factor región sobre la concentración (expresada en porcentaje) de cada uno de los AG del perfil lipídico, incluidos los 2 de interés para el estudio (AL y AAL).

Los resultados obtenidos demostraron que las concentraciones (%) de la mayoría de los AG poseen una diferencia altamente significativa. En este contexto, O'Donnell *et al.* (2011) mencionan que se evidencia diferencia estadística ( $p \leq 0,05$ ) en casi todo el perfil de AG frente al factor región geográfica. Por otro lado, Larsen *et al.*

(2010) indican que en todo perfil lipídico analizado existe variación de al menos un tercio de los AG. Dicha variación se atribuye a la influencia de la región, debido a que las condiciones ambientales, incluida la altitud, afectan la composición de los AG en la leche. Además, Liang *et al.* (2017) afirman que las diferencias en la composición de los AG son probables, dadas las distintas especies de plantas de las que se alimentan los bovinos presentes en las diferentes altitudes de las regiones. En la misma línea, Kebede (2016) menciona la existencia de factores influyentes tanto en la calidad de la leche como en el perfil lipídico, entre ellos el clima y la ubicación del ganado. Del mismo modo, Kadzere *et al.* (2002) y Yang *et al.* (2013) manifiestan que el ambiente cálido y húmedo que varía entre las regiones influyen en las funciones fisiológicas de los bovinos, y esto afecta directamente a la calidad del perfil lipídico.

### **Análisis de la influencia de la región sobre AL y AAL**

Los resultados obtenidos en cuanto a AL y AAL son expuestos en la tabla 4. El análisis de AL evidencia que este AGP posee una alta diferencia significativa ( $p \leq 0,01$ ). La región Costa se diferencia de las otras regiones y se destaca la región Amazónica como aquella que posee la mayor concentración (%) del AGP, lo que alude a la existencia de influencia del factor región sobre la concentración de

AL. En el mismo contexto, Larsen *et al.* (2010) también encontraron diferencia en la concentración de este AG frente a distintas localidades en Suecia. A su vez, O'Donnell *et al.* (2011) obtuvieron diferencia significativa al analizar la interacción de la concentración del AL con el factor región de distintas localidades de Estados Unidos. Finalmente, Yang *et al.* (2013), estadísticamente, evidenciaron diferencia significativa del ácido en estudio frente a 6 diferentes localidades de China.

**TABLA 4.** Análisis de variancia y coeficiente de correlación del perfil lipídico de leche de vaca

Ácido graso	Significancia	Costa		Sierra		Amazonía	
		$\bar{X}$ (%)	Rango	$\bar{X}$ (%)	Rango	$\bar{X}$ (%)	Rango
C6:0	*	0,55	B	0,42	AB	0,34	A
C8:0	**	0,53	B	0,53	B	0,37	A
C10:0	**	1,48	B	1,80	C	1,14	A
C12:0	**	2,27	B	2,82	C	1,79	A
C14:0	**	10,54	B	10,82	B	8,18	A
C15:0	**	1,42	B	1,28	AB	1,11	A
C16:1	NS	1,66	A	2,00	A	1,12	A
C16:0	*	31,55	B	29,83	AB	29,39	A
C17:0	*	0,74	B	0,59	A	0,63	AB
C18:2n6 <sup>a</sup>	**	2,07	A	3,03	B	3,06	B
C18:1n9	NS	27,19	A	25,73	A	26,8	A
C18:1n9t	**	1,03	A	1,45	AB	1,59	B
C18:1 11t	**	5,06	A	5,91	A	7,22	B
C18:0	**	13,84	A	13,75	A	17,20	B
C18:3n3 <sup>b</sup>	NS	0,07	A	0,06	A	0,06	A

<sup>a</sup>: AL. <sup>b</sup>: AAL. \*: diferencia significativa ( $p \leq 0,05$ ). \*\*: alta diferencia significativa ( $p \leq 0,01$ ); NS: no significativo.

Los resultados obtenidos en cuanto al AAL no presentaron diferencia significativa ( $p \leq 0,05$ ), manteniéndose constantes en las 3 regiones analizadas. Esto se resume en que el factor región no influye en la concentración de este AGP. Resultado que difiere de lo expuesto por Liang *et al.* (2017), quienes revelan que este ácido, junto con otros de la familia omega-3, se ve afectado por el factor región y, por tanto, presenta diferencias significativas en su contenido. A su vez, Larsen *et al.* (2010) también evidenciaron una influencia de este factor sobre el AAL. Este fenómeno se atribuye a la variación en la alimentación.

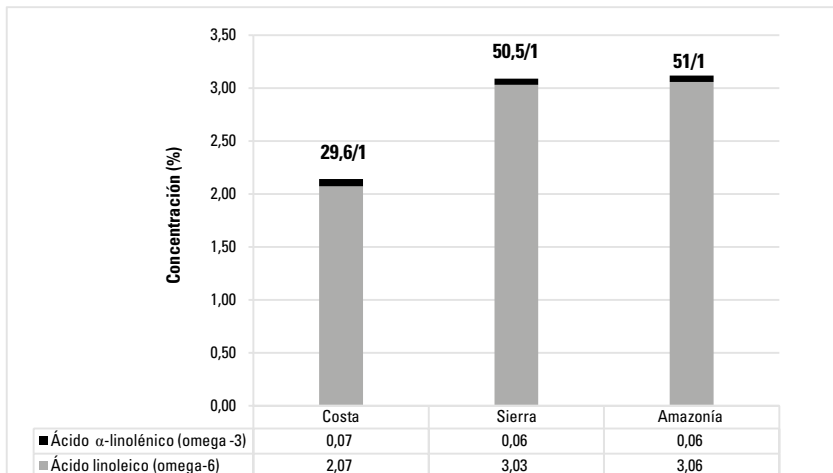
Adicionalmente, en la figura 2 se presenta la relación existente entre el AL y AAL en cuanto al factor región. Se evidencia que la relación de la región Costa es la más baja (29,6:1), la misma no se encuentra dentro de los rangos establecidos por Yang *et al.* (2013) en diferentes localidades de China, los cuales van de 7,4:1 a 13,8:1. A su vez, tampoco se muestra similitud con el país vecino de Colombia, ya que un

estudio realizado por Prieto *et al.* (2016) en diferentes localidades reveló que la relación AL:AAL tuvo un rango de 4,1:1 a 9,24:1.

**Análisis de la influencia de la época sobre el perfil lipídico**

La época se puede considerar como un factor externo sustancial de variación en la composición de los AG en leche de vaca (Hanuš *et al.* 2016). Por ello, la tabla 5 expone la significancia estadística de los resultados obtenidos del análisis de varianza de la influencia del factor época (seca y lluviosa) en la región Sierra sobre el perfil lipídico de leche cruda de vaca, incluidos los 2 AG de interés para el estudio (AL y AAL).

Se resalta que en la mayoría de los AG analizados no existió diferencia estadística significativa ( $p \leq 0,05$ ), lo que implica que la época no es un factor influyente en la concentración de los AG. Estos resultados son opuestos a los obtenidos por O'Donnell *et al.* (2011), ya que su investigación, realizada en 48 estados de



**FIGURA 2.** Relación AL:AAL encontrada en leche cruda de vaca en 3 regiones de Ecuador

**TABLA 5.** Análisis de variancia y coeficiente de correlación del perfil lipídico de leche de vaca en 2 épocas en la región Sierra

Ácido graso	Significancia	Seca		Lluviosa	
		$\bar{X}$ (%)	Rango	$\bar{X}$ (%)	Rango
C6:0	**	0,63	B	0,42	A
C8:0	NS	0,61	A	0,53	A
C10:0	NS	1,80	A	1,83	A
C12:0	NS	2,85	A	2,82	A
C14:0	NS	11,21	A	10,82	A
C15:0	NS	1,34	A	1,28	A
C16:1	NS	1,67	A	2,00	A
C16:0	NS	31,23	A	29,83	A
C17:0	NS	0,58	A	0,59	A
C18:2n6 <sup>a</sup>	NS	2,63	A	3,03	A
C18:1n9	**	23,52	A	25,73	B
C18:1n9t	**	3,74	B	1,45	A
C18:1 11t	NS	5,95	A	5,91	A
C18:0	NS	12,07	A	13,75	A
C18:3n3 <sup>b</sup>	NS	0,14	A	0,06	A

<sup>a</sup>: AL. <sup>b</sup>: AAL. \*: diferencia significativa ( $p \leq 0,05$ ). \*\*: alta diferencia significativa ( $p \leq 0,01$ ). NS: no significante.

los Estados Unidos, evidenciaron diferencia estadística ( $p \leq 0,05$ ) de más del 85% del perfil de AG frente al factor época. En el mismo contexto, Martínez *et al.* (2010) mencionan que en el sur de Estados Unidos se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas, ya que destacan que la producción de leche y calidad del perfil lipídico es baja en verano, o época cálida-seca, comparada con la del invierno, o época de lluvia, esto debido a que en las sequías o épocas veraniegas las vacas sufren estrés por calor, patología asociada a temperaturas ambientales superiores a 25°C, lo que indirectamente afecta la producción y calidad de la leche en cuanto al contenido de AG.

Investigaciones realizadas en China por Yang *et al.* (2013) indican que los AG láurico (C12:0), mirístico (C14:0) y palmítico (C16:0) presentan mayor concentración y diferencia estadística significativa ( $p \leq 0,05$ ) en época seca. Estos resultados difieren de los presentados, ya que estos AG se encuentra en mayor concentración en la época seca, pero no poseen una diferencia estadística frente a la época lluviosa.

En cuanto al ácido oleico (C18:1n9), Lindmark (2008) y Martínez *et al.* (2010) encontraron diferencia significativa al analizarlo en distintos meses con características climáticas diferentes. Adicionalmente,

los resultados del análisis estadístico para el ácido eláidico (C18:1n9t) también mostraron diferencia significativa. Este resultado es similar a lo expuesto por Lindmark (2008) y Larsen *et al.* (2010), y es consistente con la variación del ácido oleico debido a la transformación química que este sufre, ya que pasa de forma “cis” a forma “trans”, lo que resulta en ácido eláidico. Esta transformación se da mediante la biohidrogenación ruminal y por la acción de bacterias en el rumen (Guzmán 2011).

### **Análisis de la influencia de la época sobre AL y AAL**

En cuanto a los 2 ácidos en estudio, la tabla 5 señala que el AL y el AAL no poseen una diferencia estadística frente al factor época, lo que expresa que este factor no influye sobre la concentración de estos AGP. Dichos resultados coinciden con investigaciones realizadas por Lindmark *et al.* (2003), O'Donnell *et al.* (2011) y Ozcan *et al.* (2015), las cuales revelaron que la época no es considerado un factor que altere la concentración de AL y AAL. No obstante, los resultados obtenidos también son contrarios a los mencionados por Frelich *et al.* (2012) y Larsen *et al.* (2010), quienes señalaron que la concentración de estos ácidos si se vio afectada por el factor época, ya que los mismos presentaron un aumento en verano. Cabe mencionar que estas investigaciones fueron realizadas en República Checa y Suecia, países con estaciones climáticas marcadas.

Lo expuesto se fundamenta en que existen oscilaciones periódicas del perfil de AG en la leche de vaca debidas a que las variaciones climáticas estacionales van de la mano de cambios en la alimentación del ganado (Roca y González 2005). Este es uno de los factores más influyentes en

la variación del contenido de AG, dado que el clima afecta las especies de plantas cultivadas para ganadería y esto genera una variación en la composición del perfil lipídico de los vegetales y, por ende, en el de la leche de los ruminantes (Larsen *et al.* 2010). Por esta razón, la composición de la dieta suministrada a los bovinos puede ocasionar cambios en la diversidad microbiana y en los procesos metabólicos del rumen y, por consiguiente, cambios en el flujo duodenal y en la concentración de cada AG presente en la leche (Hanus *et al.* 2016).

En cuanto al AL, los resultados son similares a los del estudio realizado por Hanuš *et al.* (2016), en la República Checa, los cuales muestran que la concentración de este ácido no se vio afectada por la época, y su menor concentración se dio en época seca. Del mismo modo en leche de Alemania tampoco se evidenció influencia de este factor sobre la concentración de AL, según estudios presentados por Ruano (2005).

Los resultados de la concentración del AAL concuerdan con los reportados en una investigación de granjas influenciadas por la época de invierno y verano realizado por Frelich *et al.* (2012) y con estudios realizados en Turquía por Ozcan *et al.* (2015), en los que no se encontró ningún efecto de la época sobre el contenido de AAL.

Cabe destacar que, numéricamente, el AL presentó menor concentración (%) en época seca y mayor concentración en época lluviosa, mientras que en el AAL los datos son opuestos. Por lo mencionado, los resultados obtenidos poseen concordancia con lo expuesto por Ruano (2005), quien señala que el porcentaje en peso del AAL es mayor en el verano, o época seca, que en el invierno, o época lluviosa, en el cual cambió de 0,61 a 0,42%. En



la misma línea, los resultados con mayor concentración de AAL se dieron en verano o época seca, de acuerdo con las investigaciones realizadas por Hanuš *et al.* (2016) y Lindmark *et al.* (2003).

Con base en la importancia del AL y AAL, Katdare *et al.* (2019) y McGuffey (2017) mencionan que son constituyentes de membranas celulares y controladores de transcripción, puntos primordiales en una serie de procesos que aseguran el adecuado funcionamiento del cuerpo humano; sin embargo, este adecuado funcionamiento se basa en la relación existente entre estos 2 AGP. Por lo detallado, la figura 3 muestra la relación existente de AL y AAL en cuanto al factor época. Se destaca la época seca como aquella que posee una menor relación de AL:AAL, información similar a la de los resultados expuestos por Frelich *et al.* (2012), en Polonia, ya que su investigación reveló un aumento estacional del AAL frente al AL, lo que genera una relación más baja en verano o época seca. Indiscutiblemente esta relación es sumamente interesante ya que,

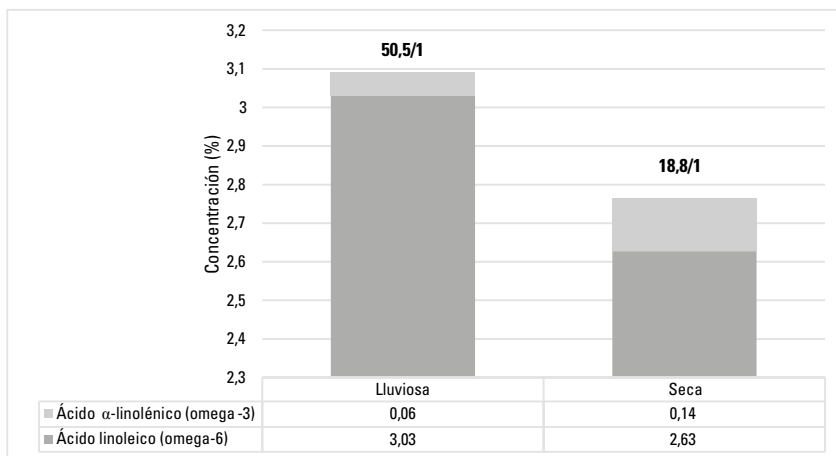
como mencionan Ortega *et al.* (2013), en la leche cruda de vaca se busca una relación AL:AAL (omega-6:omega-3) lo más baja posible.

En el presente estudio, la relación resultante en la época seca se acerca al rango de relación 15:1 a 16,7:1 expuesto en las dietas lácteas occidentales, las cuales se caracterizan por poseer una evidente ventaja del suministro de AL (Cholewski *et al.* 2018).

### CONCLUSIONES

En el análisis de cromatografía acoplada a espectrometría de masas, se encontraron 15 AG en cada muestra, con mayor concentración de los ácidos palmítico (C16:0), oleico (C18:1n9) y esteárico (C18:0); además, se revelaron las concentraciones promedio de AL 2,72% y AAL 0,06%, con una relación AL:AAL de 45,3:1.

Se determinó la influencia del factor región sobre la concentración (%) de AL; sin embargo, no se evidenció influencia en la concentración de AAL. La relación



**FIGURA 3.** Relación AL:AAL encontrada en leche cruda de vaca en época seca y lluviosa de la región Sierra de Ecuador

de estos AG en la Sierra y Amazonía presentaron valores próximos, y la relación encontrada en la Costa (29,6:1) fue la más apropiada para el consumo humano. En cuanto al factor época se concluye que no existe una influencia del mismo sobre la concentración del AL y AAL. Adicionalmente, la relación de estos AG se redujo de 50,5:1, en época lluviosa, a 18,8:1 en época seca. Esta última presenta mejor relación.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

### Fuentes de financiación

Este trabajo se llevó a cabo con el apoyo financiero de la Universidad Politécnica Salesiana.

### Agradecimientos

Se expresa agradecimiento con el grupo de Investigación Nunkui Wakan, el Laboratorio de Calidad de Leche-Cayambe y Ecuajugos-Nestlé por el apoyo técnico proporcionado.

## REFERENCIAS

Abril A, Pillco V, Torres A. 2013. Calidad fisicoquímica de la leche cruda que ingresa a la ciudad de Cuenca, para su comercialización. [Trabajo de pregrado]. [Cuenca, Ecuador] Universidad de Cuenca. Disponible en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/4825/1/TESIS.pdf>

Badui S. 2011. Química de los alimentos. 7.<sup>a</sup> ed. México: Pearson Educación de México S. A.

Cabezas C, Hernández B, Vargas M. 2016. Aceites y grasas: Efectos en la salud y regulación mundial. *Rev Fac Med.* 64(4):761-768. Doi: 10.15446/revfacmed.v64n4.53684.

Calvo M, Castro M, García A, Rodríguez L, Juárez M, Fontecha J. 2014. Grasa láctea: una fuente natural de compuestos bioactivos. *Alim Nutri Salud.* 21(3):57-63. Doi: 1136-4815/14/57-63.

Cañadas L. 1983. El mapa bioclimático y ecológico del Ecuador. Quito: MAG-PRONAREG.

Carrero J, Martín E, Baró L, Fonollá J, Jiménez J, Boza J, López E. 2005. Efectos cardiovasculares de los ácidos grasos omega-3 y alternativas para incrementar su ingesta. *Nutr Hosp.* 20(1):63-69. Disponible en: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0212-16112005000100010](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112005000100010)

Castro H. 2014. Efecto de la estrategia de alimentación y el genotipo sobre la producción, composición y perfil de ácidos grasos de la leche de vacas en pastoreo en el Valle de Toluca. [Tesis de maestría]. [Toluca, México] Universidad Autónoma del Estado de México. Disponible en: <http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/58799/MCARN-HCH-06-14.pdf?sequence=1&isAllowed=>

Cheng J, Wang J, Bu D, Liu G, Zhang C, Wei H, Zhou L, Wang J. 2008. Factors affecting the lactoferrin concentration in bovine milk. *J Dairy Sci.* 91(3):970-976. Doi: 10.3168/jds.2007-0689.

Cholewski M, Tomczykowa M, Tomczyk M. 2018. A comprehensive review of chemistry, sources and bioavailability of omega-3 fatty Acids. *Nutrients.* 10(11):1662. Doi: 10.3390/nu10111662.

Conte G, Ciampolini R, Cassandro M, Lasagna E, Calamari L, Bernabucci U, Abeni F. 2018. Feeding and nutrition management of heat-stressed dairy ruminants. *Ital J Anim Sci.* 17(3):604-620. Doi: 10.1080/1828051X.2017.1404944.

Cruz A, Lizarazo C, Porras J. 2017. Efecto de la suplementación con *Medicago sativa* (Alfalfa) sobre algunos parámetros de la leche bovina. *Rev Investig Vet del Perú.* 28(4):852-860. Doi: 10.15381/rivep.v28i4.13870.

Das R, Sailo L, Verma N, Bharti P, Saikia J, Imtiwati, Kumar R. 2016. Impact of heat stress on health and performance of dairy animals: A review. *Vet World.* 9(3):260-268. Doi: 10.14202/vetworld.2016.260-268.

Delage B. 2019. Essential fatty acids. Instituto Linus Pauling. Oregon State University [Internet]. [citado 2019 Ago 28]. Disponible en: <https://lpi.oregonstate.edu/mic/other-nutrients/essential-fatty-acids#authors-reviewers>

Echeverri J, Restrepo L. 2009. Efecto meteorológico sobre la producción y calidad de la leche en dos municipios de Antioquia-Colombia. *Lasallista*

- Investig. 6(1):50-57. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/695/69514350008.pdf>
- Frelich J, Šlachta M, Hanuš O, Špička J, Samková E, Węglarz A, Zapletal P. 2012. Seasonal variation in fatty acid composition of cow milk in relation to the feeding system. *Anim Sci Pap Reports*. 30(3):219-229. Disponible en: <http://archiwum.ighz.edu.pl/files/objects/7499/66/pp219-230.pdf>
- García C, Montiel R, Borderas T. 2014. Grasa y proteína de la leche de vaca: componentes, síntesis y modificación. *Arch Zootec*. 63:85-105. Disponible en: [http://www.uco.es/organiza/servicios/publica/az/php/img/web/19\\_10\\_27\\_3153REVISIONGrasaGarcia.pdf](http://www.uco.es/organiza/servicios/publica/az/php/img/web/19_10_27_3153REVISIONGrasaGarcia.pdf)
- Gebreyowhans S, Lu J, Zhang S, Pang X, Lv J. 2019. Dietary enrichment of milk and dairy products with n-3 fatty acids: A review. *Int Dairy J*. 97:158-166. Doi: 10.1016/j.idairyj.2019.05.011
- Gil A, Ruiz M. 2015. Tratado de nutrición, composición y calidad nutritiva de los alimentos. 2.ª ed. Madrid: Panamericana. Disponible en: <https://books.google.com/books?id=hcwBJ0FNvqYC&pgis=1>
- Guo J, Gao S, Quan S, Zhang Y, Bu D, Wang J. 2018. Blood amino acids profile responding to heat stress in dairy cows. *Asian-Australasian J Anim Sci*. 31(1):47-53. Doi: 10.5713/ajas.16.0428
- Guzmán A. 2011. Perfil lipídico y contenido de ácidos grasos trans en productos ecuatorianos de mayor consumo. [Trabajo de pregrado]. [Quito, Ecuador]. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Disponible en: <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/3721/T-PUCE-3366.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Hanuš O, Krížová L, Samková E, Špička J, Kucera J, Klimešová M, Roubal P, Jedelská R. 2016. The effect of cattle breed, season and type of diet on the fatty acid profile of raw milk. *Arch Anim Breed*. 59:373-380. Doi: 10.5194/aab-59-373-2016
- Herbut P, Angrecka S, Walczak J. 2018. Environmental parameters to assessing of heat stress in dairy cattle-a review. *Int J Biometeorol*. 62(12):2089-2097. Doi: 10.1007/s00484-018-1629-9
- Herrera M, Flores M, Pámanes G, Rosales O, Pacheco J. 2015. Metodología para la extracción, identificación y cuantificación de ácidos grasos en la dieta y leche de cabras. *Inifap*. 74:3-24. Disponible en: <http://www.zacatecas.inifap.gob.mx/publicaciones/metoAcidosGLeche.pdf>
- Hershberger U. 2012. Producción y calidad de leche de vacas en pastoreo o en estabulación. [Trabajo de pregrado]. [Chapingo, México] Universidad Autónoma Chapingo. Disponible en: [https://www.chapingo.mx/produccionanimal/administrador/components/com\\_jresearch/files/theses/PPA\\_MC\\_044\\_09\\_12\\_AGR\\_UHDA.pdf](https://www.chapingo.mx/produccionanimal/administrador/components/com_jresearch/files/theses/PPA_MC_044_09_12_AGR_UHDA.pdf)
- Inen. 2012. Norma Técnica Ecuatoriana 9:2012. Quito. Disponible en: [https://181.112.149.204/buzon/normas/nte\\_inen\\_9-5.pdf](https://181.112.149.204/buzon/normas/nte_inen_9-5.pdf)
- Kadzere C, Murphy M, Silanikove N, Maltz E. 2002. Heat stress in lactating dairy cows: a review. *Livest Prod Sci*. 77(1):59-91. Doi: 10.1016/S0301-6226(01)00330-X
- Katdare A, Thakkar S, Dhepale S, Khunt D, Misra M. 2019. Fatty acids as essential adjuvants to treat various ailments and their role in drug delivery: A review. *Nutrition*. 65:138-157. Doi: 10.1016/j.nut.2019.03.008
- Kebede D. 2016. Impact of climate change on livestock productive and reproductive performance. *Livest Res Rural Dev [Internet]*. [citado 2019 Jun 22]; 28(12). Disponible en: <http://www.lrrd.org/lrrd28/12/kebe28227.htm>
- Larsen M, Nielsen J, Butler G, Leifert C, Slots T, Kristiansen G, Gustafsson A. 2010. Milk quality as affected by feeding regimens in a country with climatic variation. *J Dairy Sci*. 93(7):2863-2873. Doi: 10.3168/jds.2009-2953
- Liang K, Zhao Y, Han J, Liu P, Qiu J, Zhu D, Qin Y, Lu L, Wang X. 2017. Fatty acid composition, vitamin A content and oxidative stability of milk in China. *J Appl Anim Res*. 46(1):566-571. Doi: 10.1080/09712119.2017.1360186
- Lindmark H. 2008. Fatty acids in bovine milk fat. *Food Nutr Res*. 52(1):1821. Doi: 10.3402/fnr.v52i0.1821
- Lindmark H, Fondén R, Pettersson H. 2003. Composition of Swedish dairy milk. *Int Dairy J*. 13(6):409-425. Doi: 10.1016/S0958-6946(03)00032-3

- Marrero D. 2006. Obtención y determinación de ácidos grasos de muy elevada masa molecular. *Rev Cenic Ciencias Químicas*. 37(1):23-33. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/1816/181620524007.pdf>
- Martínez A, Gómez P, Pérez L, Juárez M, Gómez A, Pérez M, De la Fuente M. 2013. Adición de aceites vegetales a la dieta de cabras lecheras: efecto sobre el contenido de ácidos grasos de la grasa láctea. *Arch Med Vet*. 45:259-266. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/1730/173029279004.pdf>
- Martínez A, Moya S, González H, Hernández J, Pinelli A. 2010. Contenido de ácido linoleico conjugado (CLA) en leche de ganado lechero Holstein estabulado en el noroeste de México. *Rev Mex Ciencias Pecu*. 1(3):221-235. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-11242010000300003](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242010000300003)
- McGuffey R. 2017. A 100-year review: Metabolic modifiers in dairy cattle nutrition. *J Dairy Sci*. 100(12):10113-10142. Doi: 10.3168/jds.2017-12987
- O'Donnell A, Barbano D, Bauman D. 2011. Survey of the fatty acid composition of retail milk in the United States including regional and seasonal variations. *J Dairy Sci*. 94(1):59-65. Doi: 10.3168/jds.2010-3571
- Ortega R, Espinoza J, Palacios E, Palacios A, Arjona O, Murillo B, Rivera F. 2013. Perfil de ácidos grasos en leche de vacas Chinampas (*Bos taurus*) alimentadas con forraje fresco de matorral sarcocauléscente o heno de alfalfa. *Arch Med Vet*. 45(1):45-51. Doi: 10.4067/S0301-732X2013000100008
- Ozcan T, Yaslioglu E, Kilic I, Simsek E. 2015. The influence of the season and milking time on the properties and the fatty acid composition of the milk in different dairy cattle farms. *Mljekarstvo*. 65(1):9-17. Doi: 10.15567/mljekarstvo.2015.0102
- Pragna P, Archana P, Aleena J, Sejian V, Krishnan G, Manimaran A, Bagath M, Beena V, Kurien E, Varma G, et al. 2017. Heat stress and dairy cow: impact on both milk yield and composition. *Int J Dairy Sci*. 12(1):1-11. Doi: 10.3923/ijds.2017.1.11
- Prieto E, Mahecha L, Angulo J, Vargas J. 2016. Efecto de la suplementación lipídica sobre ácidos grasos en leche de vaca, énfasis en ácido ruménico. *Agron Mesoam*. 27(2):421-437. Doi: 10.15517/am.v27i2.22022
- Roca A, González A. 2005. Variación estacional en la composición química y en el perfil de ácidos grasos de la leche de vaca. *Ingacal*. 10:353-360. Disponible en: <http://ciam.gal/uploads/publicacions/731archivo.pdf>
- Rodríguez F. 2017. Identificación de los ácidos grasos presentes en la leche de cabra (*Capra hircus*), mediante el método de cromatografía gaseosa acoplada a masas. [Tesis de grado]. [Quito, Ecuador] Universidad Politécnica Salesiana. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/13643>
- Ruano J. 2005. Cuantificación de isómeros trans de ácidos grasos en leche cruda de la planta láctea de Zamorano por cromatografía de gases. [Tesis de grado]. [Zamorano, Honduras] Universidad Zamorano. Disponible en: <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/5218/1/AGI-2005-T030.pdf>
- Siurana A. 2015. Obtención de una leche enriquecida de forma natural en ácidos grasos omega-3 y ácido conjugado linoleico (CLA) sin disminución de la cantidad de la grasa láctea. [Tesis de doctorado]. [Barcelona, España] Universitat Autònoma de Barcelona. Disponible en: <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/328431/asm1de1.pdf?sequence=1>
- Torres X. 2018. Estudio de la producción de la industria láctea del cantón Cayambe en el período 2009-2015. [Tesis de maestría]. [Quito, Ecuador] Universidad Andina Simón Bolívar. Disponible en: <http://repositorio.uasb.edu.ec/bitstream/10644/6052/1/T2544-MAE-Torres-Estudio.pdf>
- Toyes E. 2011. Composición de la grasa láctea de cabras manejadas bajo tres sistemas de explotación en dos épocas del año. [Tesis de maestría]. [La Paz, México] Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Disponible en: [https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/235/1/toyes\\_e.pdf](https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/235/1/toyes_e.pdf)
- Yang Y, Wang J, Yuan T, Bu D, Yang J, Zhou L, Sun P, Zhang J. 2013. Impact of region on

the composition of milk fatty acids in China. J Sci Food Agric. 93(11):2864–2869. Doi: 10.1002/jsfa.5999

Zambrano D, Castillo E, Simbaña L. 2017. La producción de leche en Ecuador y Chimborazo: nuevas oportunidades e implicaciones ambientales.

Yura: Relaciones Internacionales. 10:270-289. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/322756060\\_La\\_produccion\\_de\\_leche\\_en\\_Ecuador\\_y\\_Chimborazo\\_nuevas\\_oportunidades\\_e\\_implicaciones\\_ambientales](https://www.researchgate.net/publication/322756060_La_produccion_de_leche_en_Ecuador_y_Chimborazo_nuevas_oportunidades_e_implicaciones_ambientales)

### Forma de citación del artículo:

Alvear DC, Guerrero JD, Bonifaz NF, Noriega PF. 2021. Calidad composicional y concentración de ácidos grasos omega-3 (alfa-linolénico) y omega-6 (linoleico) presentes en leche bovina de tres regiones naturales del Ecuador. Rev Med Vet Zoot. 68(2): 150-169. <https://doi.org/10.15446/rfmvz.v68n2.98027>

## INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES Y CONSIDERACIONES ÉTICAS

### Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia

La *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia* publica reportes de caso y artículos científicos, de revisión y de opinión de todas las áreas de la medicina veterinaria y la zootecnia. Para el envío de artículos a consideración del comité editorial de la revista es indispensable cumplir con los siguientes requisitos:

1. Los artículos deben ser inéditos y no deben haber sido publicados o sometidos a consideración en otras revistas o publicaciones técnico-científicas (excepto cuando hayan sido publicados como tesis de grado o como resumen en un congreso). Enviar simultáneamente un mismo artículo a consideración de dos o más revistas es una falta grave a la ética académica.
2. Los autores transfieren los derechos de publicación a la revista, tanto en su versión impresa como en línea, incluyendo esta última las diferentes bases de datos en las que se encuentre indexada la revista.
3. La publicación del artículo debe haber sido aprobada por todos los coautores (si los hubiese) y por las autoridades responsables de la institución donde se llevó a cabo la investigación.
4. El documento debe cumplir a cabalidad con las instrucciones para autores establecidas por el comité editorial descritas en el presente documento, que pueden también ser consultadas en la página de Internet <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/remvez/index>. Los artículos que no se ajusten a estas pautas serán devueltos los autores sin haber sido considerados para evaluación.

Los artículos que sean aceptados para evaluación serán enviados a un mínimo de dos pares académicos reconocidos para su evaluación. En caso de una decisión dividida por parte de los evaluadores, será el editor o el comité editorial en pleno quien determine la inclusión o el rechazo del documento. Si los artículos son aceptados para publicación, los autores deberán corregirlos de acuerdo con las observaciones de los pares y el comité editorial dentro del tiempo otorgado para ello. Las observaciones que no sean aceptadas por los autores deberán contar con un sustento apropiado que será evaluado por el editor correspondiente. El editor y el comité editorial se reservan el derecho de rechazar o aceptar los materiales enviados para su publicación.

#### TIPOS DE CONTRIBUCIÓN

La revista acepta los siguientes tipos de contribuciones originales:

- **Artículo científico:** artículo científico original que presenta los resultados de investigaciones que se rigen bajo el método científico. Típicamente consta de cuatro partes esenciales: introducción, metodología (materiales y métodos), resultados y discusión (presentados en secciones individuales o en una sola) y conclusiones.
- **Reporte de caso:** reporte de un caso clínico de relevancia, ya sea por ser el primero en su contexto específico o por sus características particulares que lo hacen de interés para la comunidad científica y por ende publicable.
- **Artículo de revisión:** revisión crítica de un tema específico desde una perspectiva analítica, interpretativa y crítica del autor, que recurre siempre a fuentes originales. Se recomienda solo para autores con experiencia investigativa demostrada en el tema. Idealmente una revisión debe presentar un resumen crítico de las investigaciones hasta ahora realizadas y proponer nuevos temas por investigar.
- **Ensayo científico:** reflexiones críticas de un autor que presenta su visión y juicio sobre un tema científico.

#### REMISIÓN DE MANUSCRITOS

Las contribuciones pueden ser enviadas en español, inglés o portugués, a los correos [rev\\_fmzbog@unal.edu.co](mailto:rev_fmzbog@unal.edu.co) o [revistafmvzun@gmail.com](mailto:revistafmvzun@gmail.com) junto a los formatos de Información Personal (uno por autor) y de Autorización de Publicación, que deberá ser firmado por todos los autores. Los formatos podrán ser descargados en el siguiente enlace: [http://bit.ly/formatos\\_revista](http://bit.ly/formatos_revista).

#### Formato

El texto del artículo debe enviarse en MS-Word®, sin incluir tablas ni figuras, las cuales deben presentarse en archivos separados. Se recomienda que el texto no tenga más de 25 páginas en tamaño carta, numeradas consecutivamente en el lado inferior derecho, con márgenes de 2,5 cm por cada lado, a doble espacio, con fuente Times New Roman, tamaño de 12 puntos, y cada línea del documento deberá estar enumerada consecutivamente (en MS-Word®: Diseño de página/Números de línea/Continua).

Las tablas y las figuras (fotografías, gráficos, dibujos, esquemas, diagramas de flujo, diagramas de frecuencia, etc.) deberán enumerarse consecutivamente en números arábigos, y además de enviarse insertadas en un archivo MS-Word® deberán incluirse los archivos originales (por ejemplo jpg o MS-Excel®), de acuerdo con el programa con el que hayan sido elaboradas. Todas las tablas y figuras deben haber sido citadas en el texto.

#### Título y autores

El título del artículo se debe presentar en español (o portugués) e inglés, en negrilla y centrado. Si incluye nombres científicos se deberá usar la nomenclatura indicada anteriormente (sistema binomial). Bajo el título se escriben los nombres y apellidos de los autores de la siguiente manera: iniciales de los nombres (con punto), seguidos del primer apellido completo, sin títulos académicos ni cargos laborales y separando cada autor con una coma. El autor para correspondencia debe identificarse con un asterisco. Como pie de página debe indicarse la filiación institucional de cada autor incluyendo la dirección, ciudad y país, y la dirección de correo electrónico del autor para correspondencia.

#### Resumen y palabras clave

Los artículos deben incluir un resumen en español (o portugués) y uno en inglés, de no más de 250 palabras. El resumen debe registrar brevemente todas las partes del documento: los propósitos del estudio o investigación, materiales y métodos (selección de los sujetos del estudio o animales de laboratorio; métodos de observación y de análisis), resultados y discusión (consignando información específica o datos y su significancia estadística siempre que sea posible), y las conclusiones principales. Deberán destacarse las observaciones y aspectos más novedosos y relevantes del estudio.

Las palabras clave (máximo cuatro) son términos para indexación del artículo en las bases de datos y los buscadores de Internet. Estas deben identificar el contenido del artículo y se deben colocar después del resumen en su correspondiente idioma. Para seleccionar las palabras clave del documento, se sugiere consultar y usar los descriptores del tesoro agrícola multilingüe Agrovoc, creado por la FAO, el cual abarca terminología de la agricultura, silvicultura, pesca, medioambiente y temas afines (<http://aims.fao.org/website/Search/sub>) o los Descriptores en Ciencias de la Salud (<http://decs.bvs.br/E/homepage.htm>) y <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=mesh>). Estas herramientas permiten seleccionar las palabras clave adecuadas para que el artículo sea difundido de forma más efectiva en Internet.

### Introducción

Debe presentar una breve revisión de los trabajos previos relacionados con el tema por investigar y finalizar con la justificación y los objetivos de la investigación. La introducción no incluirá datos o conclusiones del trabajo que se está publicando.

### Materiales y métodos

En esta sección se deben describir de forma clara, concisa y secuencial, los materiales (animales, implementos de laboratorio) utilizados en desarrollo del trabajo, además de los procedimientos o protocolos seguidos y el diseño experimental escogido para el tratamiento estadístico de los datos. La información aquí consignada debe permitir a otros investigadores reproducir el experimento en detalle. Este apartado puede tener subtítulos y no debe incluir ningún resultado ni discusión de los hallazgos.

### Resultados

En esta sección se deben describir los resultados en orden lógico y de manera objetiva y secuencial, apoyándose en las tablas y figuras. Este apartado puede también incluir subtítulos y no debe discutir los datos presentados.

### Discusión

La discusión debe ser una síntesis de la confrontación de los datos obtenidos en el estudio con respecto a la literatura científica relevante que además interprete las similitudes o los contrastes encontrados. Se enfocará hacia la interpretación de los hallazgos experimentales y no repetirá los datos presentados en la introducción ni la información suministrada en los resultados. Las secciones correspondientes a resultados y discusión pueden combinarse en una sola.

### Conclusiones

En esta sección se relacionan los hallazgos más relevantes de la investigación, es decir, aquellos que constituyan un aporte significativo para el avance del campo temático explorado, además de considerar un direccionamiento sobre futuras investigaciones.

### Agradecimientos

Si se considera necesario, se agradecen contribuciones importantes en cuanto a la concepción, financiación o realización de la investigación: financiadores, especialistas, firmas comerciales, entidades oficiales o privadas, asociaciones de profesionales y operarios de campo y laboratorio.

### Tablas

- Se deben evitar las tablas demasiado grandes. Si se tienen muchos datos en una tabla, se recomienda dividirla en dos o más.
- Cada tabla debe tener un título corto y explicativo en la parte superior, sin abreviaturas.
- No deben emplearse líneas verticales para separar las columnas y, por tanto, debe existir suficiente espacio entre ellas.
- Cualquier explicación esencial para entender la tabla debe presentarse como una nota en la parte inferior de esta.
- Los encabezados de columna deben ser breves pero suficientemente explicativos.
- Cada tabla debe haber sido referenciada en el texto.

### Figuras

- Las gráficas deben ser de una sola tinta con porcentajes de negro para las variaciones de las columnas, las líneas de las curvas deben ser de color negro, punteadas o continuas usando las siguientes convenciones: ▲, ■, ●, ◆, ◇, ○, □, △.
- En caso de fotografías o mapas (originales o escaneados) estos deben enviarse en archivos independientes, en formato tiff o jpg con un mínimo de 600 dpi de resolución y adicionalmente dentro de un archivo MS-Word® en el que se incluya su título (corto y explicativo) en la parte inferior.

- Al igual que las tablas, deben enumerarse con números arábigos en forma consecutiva, y debe hacerse referencia en el texto a cada una de las figuras presentadas.

### Nomenclatura

- Las unidades deben expresarse de acuerdo con el Sistema Métrico Decimal (SI).
- Los autores aceptarán la normatividad colombiana, así como la trazada por el *International Code of Botanical Nomenclature*, el *International Code of Nomenclature of Bacteria*, y el *International Code of Zoological Nomenclature*.
- Toda la biota (cultivos, plantas, insectos, aves, mamíferos, peces, etc.) debe estar identificada en nomenclatura binomial (nombre científico), a excepción de los animales domésticos comunes.
- Todos los medicamentos, biocidas y demás sustancias de uso comercial deben presentar el nombre de su principio activo principal o nombre genérico.
- Para la nomenclatura química se usarán las convenciones determinadas por la *International Union of Pure and Applied Chemistry así como por la Comisión on Biochemical Nomenclature*.

### Referencias

La citación de referencias bibliográficas que sustentan frases dentro del texto se debe ceñir a las normas de estilo del Council of Science Editors (CSE) algunas de las cuales se muestran a continuación: dentro del texto se hará uso del sistema "autor(es) año" si se trata de uno o dos autores: (Jiménez 2009), (Pineda y Rodríguez 2010); si la publicación citada tiene tres o más autores, se cita el apellido del primer autor acompañado de la expresión latina *et al.*: (Bernard *et al.* 2003). Si se citan varias referencias seguidas, deberán organizarse en orden alfabético, separadas por punto y coma (;): (Hänsel y Gretel 1990; Hergé *et al.* 1983). Si el autor o autores se citan directamente en el texto se utiliza la misma notación pero con el año entre paréntesis: Wagner (1982) encontró que el agua es vida, mientras que Vivaldi y Pergolesi (1988) afirman lo contrario; los investigadores Magendie *et al.* (1845) descubrieron que los perros tienen cuatro patas.

Las referencias bibliográficas completas van al final del artículo en orden alfabético de autores; si en la lista de referencias se citan varias publicaciones del mismo autor o autores se listan en orden cronológico desde la más antigua hasta la más reciente.

Las contribuciones que no cumplan con las normas de estilo bibliográfico serán devueltas sin ser consideradas para evaluación.

Para obtener más ejemplos sobre el sistema de citación del Council of Science Editors (CSE) recomendamos remitirse al siguiente enlace: <http://www.scientificstyleandformat.org/Tools/SSF-Citation-Quick-Guide.html>

- **Libros**  
Gilman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P. 1990. The Pharmacological Basis of Therapeutics. 8th ed. New York: Pergamon Press. 1811 p.
- **Capítulos de libro**  
Diaz GJ. 2001. Naturally occurring toxins relevant to poultry nutrition. En: Leeson S, Summers JD, editores. Scott's Nutrition of the Chicken. 4th ed. Guelph: University Books. p. 544-591.
- **E-Book**  
Rollin, BE. 1998. The unheeded cry: animal consciousness, animal pain, and science [Internet]. Ames (IA): Iowa State University Press; [Citado 2008 agosto 9]. Disponible en: <http://www.netlibrary.com>.
- **Artículo de revista**  
Hepworth PJ, Nefedov AV, Muchnik IB, Morgan KL. 2010. Early warning for hock burn in broiler flocks. *Avian Pathol.* 39:405-409. Doi: 10.1080/03079457.2010.510500.

Nota: se deben anotar las iniciales de todos nombres que tengan los autores. Los nombres de las revistas se deben registrar en su forma abreviada; para consultar el nombre abreviado de las revistas sugerimos consultar el ISI Journal Title Abbreviations: <http://www.efm.leeds.ac.uk/~mark/ISLabbr/>

• **Artículo de revista publicada únicamente en forma electrónica**

Leng F, Amado L, McMacken R. 2004. Coupling DNA supercoiling to transcription in defined protein systems. *J Biol Chem* [Internet]. [citado 2007 July 24]; 279(46):47564-47571. Disponible en: <http://www.jbc.org/cgi/reprint/279/46/47564>

**Otras fuentes de información**

• **Memorias de eventos**

Cheeke PR. 2010. Agricultural and pharmaceutical applications of Chilean soapbark tree (*Quillaja saponaria*) saponins. In: 8<sup>th</sup> International Symposium on Poisonous Plants; 2009 mayo 4-8, João Pessoa, Paraíba, Brazil, p. 38.

• **Tesis**

Murcia HW. 2010. Identificación funcional de citocromos involucrados en la biotransformación *in vitro* de aflatoxina B1 por medio de sustratos modelo e inhibidores específicos en cuatro especies de aves. [Tesis de maestría]. [Bogotá, Colombia] Universidad Nacional de Colombia.

**NORMAS DE ESTILO**

- Se debe redactar en voz activa (se evaluaron dos metodologías, y no: dos metodologías fueron evaluadas) y en forma impersonal, es decir, tercera persona del singular (se encontró, y no: encontré o encontramos).
- En cuanto a los tiempos verbales, el uso común es el pasado para la introducción, procedimientos y resultados, y el presente para la discusión.
- En general, se recomienda evitar el uso del gerundio. Recurra a esta forma verbal solo para indicar dos acciones simultáneas; en los demás casos, redacte diferente la frase (reemplazar: un protocolo fue establecido, minimizando el efecto negativo... por: se estableció un protocolo con el cual se minimizó el efecto negativo...).
- Las letras cursivas o itálicas se usan para los nombres científicos (sistema binomial) y palabras o expresiones en idioma extranjero.
- El significado de las siglas y abreviaturas debe explicarse cuando se mencionan por primera vez en el texto. Posteriormente, se debe usar solamente la sigla o abreviatura.
- Las siglas no tienen forma plural; este se indica en las palabras que la acompañan: las ONG, dos Elisa.
- Las abreviaturas del SI no deben ir con punto, en plural o en mayúscula: 1 kg, 25 g, 10 cm, 30 m, etc. Las abreviaturas más usadas en esta revista son las siguientes:

km	kilómetro	μM	micromolar
m	metro	N	normal
cm	centímetro	ppm	partes por millón (1 x 10 <sup>-6</sup> )
mm	milímetro	ppb	partes por billón (1 x 10 <sup>-9</sup> )
μm	micrómetro	cpm	cuentas por minuto
nm	nanómetro	dpm	desintegraciones por minuto
kg	kilogramo	s	segundos
g	gramo	min	minutos
mg	miligramo	h	hora
μg	microgramo	SC	subcutáneo
ng	nanogramo	Im.	intramuscular
l	litro	IP	intra peritoneal
ml	mililitro	iv.	intravenoso
μl	microlitro		
m	mol		
M	molar		
mM	milimolar		

- Entre el valor numérico y el símbolo debe ir un espacio: 35 g (no 35g), p > 12 (no p>12); excepto para los signos: °C, %, +, - (estos dos últimos cuando indican positivo y negativo). Ejemplos: 99%, +45, -37.
- En una serie de medidas, el símbolo va al final: hileras a 3, 6 y 9 m, o 14, 16 y 18%.
- La barra oblicua (/) es un signo lingüístico que en alguno de sus usos significa "por": tres perros/perrera, 4 tabletas/día, 2 l/matera, 10 frutos/rama. Uno de sus usos no lingüísticos es expresar los cocientes de magnitudes y unidades de medida: 80 km/h, 10 ml/min, 10°C/h.
- Uno de los usos no lingüísticos del punto (·) es indicar la multiplicación de dos cantidades, caso en que se coloca separado de estas y a media altura: 6 · 3 = 18; 2 · (x + y) = 30.
- El punto (.) se usa para separar los miles y la coma (,) se usa para separar decimales.
- Las unidades que se basan en nombres se usan en minúsculas: un siemens (con algunas excepciones como cuando el símbolo se deriva de un nombre propio: °C, grados Celsius).

**CONSIDERACIONES ÉTICAS**

**Autoría.** Se considera autor a todo aquel que haya realizado una contribución directa y sustancial al contenido del manuscrito. Esta contribución debe incluir su participación en aspectos tales como la concepción del ensayo y del diseño experimental, la obtención de los datos crudos, el análisis de los datos y la interpretación de los resultados, la aplicación del modelo estadístico apropiado, la redacción del manuscrito y la investigación bibliográfica asociada. Cada autor deberá estar en capacidad de explicar su participación directa en la publicación y de sustentar el contenido de la misma ante el Comité Editorial en caso de ser requerido. La inclusión de autores honorarios (contribución autoral impropia) se considera un comportamiento no ético.

**Sometimiento de manuscritos.** Los documentos sometidos para evaluación y posible publicación no deberán ser presentados simultáneamente a otra revista (o revistas). Esto invalida su originalidad y compromete los derechos sobre su publicación.

**Integridad de la investigación.** La fabricación o falsificación de resultados a través de la manipulación de equipos, materiales o procesos de investigación, el cambio u omisión de datos y resultados, el plagio (mención de los resultados propios o de otros sin hacer claridad de ello de acuerdo con las normas de citación bibliográfica) o la publicación fragmentada (someter fragmentos de una investigación en forma de artículos independientes), son comportamientos no éticos e inaceptables.

**Conflicto de intereses.** Los autores deberán declarar no tener relaciones de interés comercial o personal dentro del marco de la investigación que condujo a la producción del manuscrito sometido.

**Reconocimientos.** Se deben describir los tipos de apoyo recibido tales como financiación, patrocinios, becas o suministro de equipos, entre otros.

**Evaluación de artículos.** Los evaluadores solo aceptarán la revisión de aquellos manuscritos cuyo tema sea de su completo dominio. Se espera una opinión objetiva desde el punto de vista académico y científico, alejada de condicionamientos personales. Durante todo el proceso, el evaluador conservará la confidencialidad total del contenido del manuscrito y no deberá transferir la responsabilidad asignada a un tercero (coinvestigador, estudiante de posgrado u otros). Si durante el periodo de revisión el evaluador considera que tiene algún impedimento de tipo ético o conflicto de intereses deberá suspender la evaluación y así comunicarlo al Comité Editorial.



## INSTRUCTIONS FOR AUTHORS AND ETHICAL CONSIDERATIONS

### *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*

The *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia* publishes case reports as well as original, review, and opinion articles in all areas of veterinary medicine and animal science.

For article submission to the editorial committee of the journal it is necessary to comply with the following requirements:

1. Contributions must be original and must not have been submitted to any other journal (except when they have been published as theses or as abstracts in a congress).
2. The authors transfer all publication rights to the journal, in both printed and electronic versions. Electronic versions include all databases where the journal has been indexed.
3. The article publication must have been approved by all coauthors and by the authorities where the research took place.
4. The submission must comply with all requirements described in the present document which can also be downloaded from the journal web site: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/remvez/index>. Submissions that do not comply with these requirements will be returned to the authors without consideration for evaluation.

Submissions accepted for evaluation will be sent to a minimum of two peer reviewers. In case of lack of consensus among the reviewers, the editor or editorial committee decides whether the contribution is accepted or not. When articles are accepted for publication the authors should revise them according to the peer's observations within the timeframe given. Observations not taken into consideration shall be appropriately supported and will be evaluated by the corresponding editor. The editor and editorial committee reserve the right to accept or reject the contributions submitted.

#### TYPES OF CONTRIBUTIONS

The journal accepts the following types of original contributions:

- **Scientific article:** original scientific paper reporting the results of a research conducted under the scientific method. It typically contains four essential parts: Introduction, materials and methods, results and discussion (either individually or combined) and conclusions.
- **Case report:** report of clinical cases that become relevant and publishable due to their specific context.
- **Review articles:** critical review of a specific topic. This type of contribution is recommended only for authors with proved research experience in the topic. It should present not only a critical review of the state of the art of the topic but also a proposal of new areas to be investigated.
- **Opinion article:** critical thoughts about a specific scientific topic.

#### ARTICLE SUBMISSION

Contributions may be submitted in Spanish, English or Portuguese through the e-mail address [rev\\_fmzbog@unal.edu.co](mailto:rev_fmzbog@unal.edu.co) or [revistafmvzun@gmail.com](mailto:revistafmvzun@gmail.com) along with the Personal Information (one per author) and Authorization of Publication formats, which must be signed by all authors. The formats can be downloaded at the following link: [http://bit.ly/formatos\\_revista](http://bit.ly/formatos_revista)

The article text must be submitted in MS-Word®, without tables or figures, which shall be sent in separate files. It is recommended that the text is not longer than 25 pages, letter size, numbered consecutively at the bottom right corner with margins of 2.5 cm on each side. Lines shall be numbered consecutively. Use Times New Roman 12 pt font.

Tables and figures shall be numbered consecutively in the text using Arabic numbers and shall be sent inserted in MS-Word® files as

well as in its original format (e.g. jpg o MS-Excel®). All tables and figures must be mentioned in the text.

#### Title and authors

The article title must be written in English and Spanish, in bold, and centered. If scientific names are used, they must be written using the binomial system. The name of the authors must be written under the title as follows: given name initials (with periods) follow by the last name with no academic titles. Each author is separated of the next one by a comma. The corresponding author will be identified with an asterisk. Each author's affiliation shall be shown as a footer including address, city and country as well as the electronic address of the corresponding author.

#### Summary and key words

Articles shall include a summary in English and another in Spanish which must contain up to 250 words. The summary shall include a brief description of all parts of the article including the objectives, materials and methods, results and discussion, and conclusions. The most important findings of the study should be highlighted in the abstract.

Key words (up to four) are terms for indexation of the article on databases and Internet search engines. They shall identify the article contents and. Key words shall be placed after the summary in each language. To select the key words it is recommended to consult the descriptors of the agricultural thesaurus AGROVOC of the FAO (<http://aims.fao.org/website/Search/sub>) and DeCS (<http://decs.bvs.br/E/homepagee.htm> and <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=mesh>). These tools help select appropriate key words so that the article is more visible on the Internet.

#### Introduction

This section shall present a brief review of previous studies related to the topic of research and shall finish with a brief justification of the study and its objectives. The introduction shall not include data or conclusions of the study being described.

#### Materials and methods

This section must describe in clear, concise and logical form both the materials (animals, laboratory equipment, etc.) used as well as the detailed description of the techniques or protocols followed. This information given shall allow another research to be able to perform the same experiment(s) in detail. This section shall also describe the statistical treatment of the data and shall not include results or discussion of the results.

#### Results

This section shall describe the results in a logical order and in an objective and sequential fashion with the help of tables and figures. This section might include subheadings and shall not discuss the data presented.

#### Discussion

This section shall be a synthesis of the comparison of the observed data against published relevant literature with an interpretation of the similarities and differences found. It will focus on the interpretation of the experimental findings and shall not repeat information presented in the introduction or the results sections. In some cases it is possible to combine the results and discussion sections in one.

#### Conclusions

This section describes the most relevant findings of the research conducted, that is, those that make a significant contribution to

the advancement of the specific topic investigated. It shall also point out towards future research needed.

### Acknowledgements

When necessary, acknowledgements can be given in this section to people or institutions that helped with the satisfactory development of the study being reported.

### Tables

- Too large tables shall be avoided. If there is too much information in a table it is recommended to split it in two or more.
- Each table shall have a short but explicative title on top (without abbreviations and with a period at the end).
- No vertical lines shall be included in the tables.
- Any additional explanation to the table shall be presented as a note at the bottom.
- Column titles shall be short but explicative.
- Each table must be referenced in the text.

### Figures

- Figures must be black and white with grayscale to show variations. The following symbols can be used for graphs: ▲, ■, ●, ◆, ◊, ○, □, △.
- Photographs or maps (either originals or scanned) must be sent as individual files, in tiff or jpg format and a minimum of 600 dpi of resolution. Additionally these graphs must be sent embedded in a MS Word® file with the title of the figure at the bottom.
- Figures shall be numbered with Arabic numbers, consecutively and each one must be referenced in the text.

### Nomenclature

- Units must be expressed in the International System of Units (SI).
- Authors must follow the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.
- All living organisms must be identified with the binomial system, except for common domestic animals.
- Drugs, biocides and all substances of commercial use shall be named by the active chemical ingredient or generic name (not the commercial name).
- For chemical notation authors must follow the rules of the *International Union of Pure and Applied Chemistry and the Commission on Biochemical Nomenclature*.

### References

For referring publications in the text, the Council of Science Editors (CSE) style must be used: "author(s) year" system shall be used for one or two authors: (Jiménez 2009), (Pineda y Rodríguez 2010); if the publication has three or more authors the last name of the first author is cited with the latin expression *et al.* in italic: (Bernard *et al.* 2003). When more than one reference is cited they shall be organized in alphabetical order, separated by a semicolon (;): (Hänsel and Gretel 1990; Hergé *et al.* 1983). When the author is cited within the sentence the same notation shall be used but with the year in brackets: Wagner (1982) found out that water wets but Vivaldi and Pergolesi (1988) do not agree; the researchers Magendie *et al.* (1845) discovered that dogs have four legs. The complete references shall be included at the end of the article according to the format described below. When two or more references of the author are cited they shall be listed in chronological order starting with the oldest one.

Contributions that do not comply with the references' requirements will be returned to the authors without consideration for publication.

For more information about the Council of Science Editors (CSE) style:

<http://www.scientificstyleandformat.org/Tools/SSF-Citation-Quick-Guide.html>

- **Book**  
Gilman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P. 1990. The Pharmacological Basis of Therapeutics. 8th ed. New York: Pergamon Press. 1811 p.
- **Book chapter**  
Diaz GJ. 2001. Naturally occurring toxins relevant to poultry nutrition. In: Leeson S, Summers JD editores. *Scott's Nutrition of the Chicken*. 4th ed. Guelph: University Books. p. 544-591.
- **E-Book**  
Rollin, BE. 1998. The unheeded cry: animal consciousness, animal pain, and science [Internet]. Ames(LA): Iowa State University Press; [Citado 2008 agosto 9]. Disponible en: <http://www.netlibrary.com>.
- **Journal article**  
Hepworth PJ, Nefedov AV, Muchnik IB, Morgan KL. 2010. Early warning for hock burn in broiler flocks. *Avian Pathology* 39:405-409. Doi: 10.1080/03079457.2010.510500. Please note that the initials of all author's given names must be included. For journal title abbreviations: <http://www.efm.leeds.ac.uk/~mark/ISlabbr/>
- **Journal article published only online**  
Leng F, Amado L, McMacken R. 2004. Coupling DNA supercoiling to transcription in defined protein systems. *J Biol Chem* [Internet]. [citado 2007 July 24]; 279(46):47564-47571. Disponible en: <http://www.jbc.org/cgi/reprint/279/46/47564>.

### Other

- **Congress/Symposium abstracts or chapters**  
Cheechee PR. 2010. Agricultural and pharmaceutical applications of Chilean soapbark tree (*Quillaja saponaria*) saponins. In: 8th International Symposium on Poisonous Plants; 2009 mayo 4-8, João Pessoa, Paraíba, Brazil, p. 38.
- **Thesis:**  
Murcia HW. 2010. Identificación funcional de citocromos involucrados en la biotransformación in vitro de aflatoxina B1 por medio de sustratos modelo e inhibidores específicos en cuatro especies de aves. [Tesis de maestría]. [Bogotá, Colombia] Universidad Nacional de Colombia.

### OTHER REQUIREMENTS

- Italic font must be used for Latin names (binomial system) and words or expression written in a different language.
- The meaning of abbreviations must be explained in full the first time they are used. Afterwards use only the abbreviation.
- Abbreviations do not have a plural form: one NGO, two ELISA.
- SI abbreviations shall not have a period at the end or be written in plural or upper case letters: 1 kg, 25 g, 10 cm, 30 m, etc. The abbreviations must commonly used in this journal are:

km	kilometer	μM	micromolar
m	meter	N	normal
cm	centimeter	ppm	parts per million (1 x 10 <sup>-6</sup> )
mm	millimeter	ppb	parts per billion (1 x 10 <sup>-9</sup> )
μm	micrometer	cpm	counts per minute
nm	nanometer	dpm	disintegrations per minute
kg	kilogram	s	seconds
g	gram	min	minutes
mg	milligram	h	hour
μg	microgram	SC	subcutaneous
ng	nanogram	Im.	intramuscular
l	liter	IP	intra-peritoneal
ml	milliliter	iv.	intravenous
μl	microliter		
m	mol		
M	molar		
mM	millimolar		

- Always insert a space between the numeric value and the symbol: 35 g (not 35g),  $p > 12$  (not  $p>12$ ); except for the signs %, +, - (these last two when meaning positive and negative). For example: 99%, +45, -37.
- In a series of measurements the symbol goes at the end. For example: 3, 6 and 9 m (except for the percentage sign which is always written: 14%, 16% and 18%).
- The slash bar (/) is a linguistic sign used sometimes instead of the word per: ten chicks /pen, 4 tablet/d, 10 fruits/branch. This symbol can be used in a non linguistic context to express quotients of measurement and unit magnitudes: 80 km/h, 10 ml/min, 10°C/h.
- The sign period can be used in a non linguistic context to indicate multiplication. In this case it is used separated and in the middle:  $6 \cdot 3 = 18$ ;  $2 \cdot (x + y) = 30$ .
- In English language the period (.) is used to separate decimals and the comma (,) to separate thousands.
- Name-based units must be written in lower case (for example: one siemens), except when they are derived from a proper name: °C, degrees Celsius.

### ETHICAL CONSIDERATIONS

**Authorship.** Only a person who has made a significant and substantial contribution to the manuscript shall be included as author. This contribution shall include his/her participation in tasks such as the conception of the experiment and the experimental design, raw data collection, data reduction analysis and interpretation of results, application of the appropriate statistical model, elaboration of the manuscript and bibliographical search. Every author shall be able to explain his direct involvement with

the manuscript and be able to defend its contents if the Editorial Committee so requires. Including honorary authors (improper author contribution) is considered unethical and unacceptable.

**Manuscript submission.** Documents submitted for evaluation and possible publication must not be submitted to other journal(s) simultaneously. This voids its originality and compromises the publication rights.

**Manuscript integrity.** Fabrication or making up results through instrument, materials or research processes manipulation, changing or omitting results or data, plagiarism (citation of his/her own or other's results without clarification according to citation rules), fragmented submission (submission of fragments as independent articles, also known as "salami science") are all considered unethical practices and are unacceptable.

**Conflict of interests.** Authors need to declare that they do not have any commercial or personal interest with the research that resulted in the production of the submitted manuscript.

**Acknowledgements.** Any type of support received, including financial resources, scholarships, and equipment, shall be mentioned and acknowledged.

**Manuscript evaluation.** Reviewers will only accept to review manuscripts that are within their area of expertise. Their opinions shall be objective and based only on academic and scientific grounds, without any personal consideration. During the evaluation process the reviewer must keep the contents of the manuscript confidential and shall not assign the reviewing task to any other person (co-researcher, graduate student, etc.). If during the reviewing process the referee finds any conflict of interest or any ethical conflict, he/she shall stop the evaluation process and let the Editorial Committee know about this.

## INSTRUÇÕES AOS AUTORES E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

### Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e de Zootecnia

A *Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e de Zootecnia* publica relatos de casos clínicos e artigos científicos, de revisão e de opinião de todas as áreas da medicina veterinária e da zootecnia. Para o envio de artigos a consideração do comitê editorial da revista é indispensável preencher os seguintes requisitos:

1. Os artigos devem ser inéditos e não ter sido publicados ou submetidos a consideração a quaisquer revistas técnico-científicas (exceto quando tenham sido publicados como dissertações ou teses de pós-graduação ou como resumos de congressos). Enviar simultaneamente o mesmo artigo a consideração a uma ou mais revistas é uma falta grave à ética acadêmica.
2. Os autores transferem os direitos de publicação à revista, tanto na sua versão impressa como *on line*, incluindo nesta última as diferentes bases de dados nas quais se encontre indexada a revista.
3. A publicação do artigo deve ter sido aprovada por todos os co-autores (se houver) e pelas autoridades responsáveis da instituição onde foi realizada a pesquisa.
4. O documento deve preencher totalmente as instruções para autores estabelecidas pelo comitê editorial descritas no presente documento, que podem também ser consultadas na página de internet <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/remevez/index>. Os artigos que não se ajustem a estas instruções serão devolvidos aos autores sem serem considerados para avaliação.

Os artigos que forem aceitos para avaliação serão enviados a um mínimo de dois pares acadêmicos reconhecidos para sua avaliação. Em caso de decisão dividida por parte dos avaliadores, será o editor ou o comitê editorial quem determine a inclusão ou rejeição do documento. Se os artigos forem aceitos para publicação, os autores deverão corrigi-los conforme às observações dos pares e o comitê editorial no tempo concedido. As observações não aceitas pelos autores deverão contar com sustentação apropriada que será avaliada pelo editor correspondente. O editor e o comitê editorial se reservam o direito de rejeitar ou aceitar os materiais enviados para sua publicação.

#### TIPOS DE CONTRIBUIÇÃO

A revista aceita os seguintes tipos de contribuições originais:

- **Artigo científico:** artigo científico original que apresente resultados de pesquisas regidas pelo método científico. Tipicamente consta de quatro partes essenciais: introdução, metodologia (materiais e métodos), resultados e discussão (apresentados em seções individuais ou em uma única seção) e conclusões.
- **Relato de caso:** relato de um caso clínico de relevância seja por seu ineditismo no seu contexto específico ou pelas suas características particulares que o fazem de interesse para a comunidade científica para sua publicação.
- **Artigo de revisão:** revisão crítica de um tema específico desde uma perspectiva analítica, interpretativa e crítica do autor, que recorre sempre a fontes originais. Recomenda-se apenas para autores com experiência investigativa demonstrada no tema. Idealmente uma revisão deve apresentar um resumo crítico das pesquisas até hoje realizadas e propor novos temas por pesquisar.
- **Ensaio científico:** reflexões críticas de um autor que apresenta sua visão e juízo sobre um tema científico.

#### ENVIO DE MANUSCRITOS

As contribuições podem ser enviadas em espanhol, inglês ou português, ao correio eletrônico: [rev\\_fmfvbzog@unal.edu.co](mailto:rev_fmfvbzog@unal.edu.co) o [revistafmvzun@gmail.com](mailto:revistafmvzun@gmail.com) com o formato de Informações Pessoais (um por autor) e Autorização de lançamento, que deve ser

assinada por todos os autores. Os formulários podem ser baixados no seguinte link: [http://bit.ly/formatos\\_revista](http://bit.ly/formatos_revista)

#### Formato

O texto do artigo deve enviar-se em MS-Word, sem incluir tabelas nem figuras, as quais devem apresentar-se em arquivos separados. Recomenda-se que o texto não tenha mais que 25 páginas em tamanho carta, numeradas consecutivamente no lado inferior direito, com margens de 2,5 cm por cada lado, em espaço duplo, com fonte Times New Roman, tamanho 12, e cada linha do documento deverá estar numerada de forma contínua. As tabelas e figuras (fotos, gráficos, desenhos, esquemas, diagramas de fluxo, diagramas de frequência, etc.) deverão numerar-se consecutivamente em números arábicos, e enviar-se inseridas em arquivo MS-Word com os arquivos originais (por exemplo, jpg ou excel), conforme o programa em que foram elaboradas. Todas as tabelas e figuras devem ser referenciadas no texto.

#### Título e autores

O título do artigo deve ser em espanhol, português ou inglês, em negrito e centralizado. Se tiver nomes científicos deverá usar a nomenclatura indicada anteriormente (sistema binomial). Embaixo do título se escrevem os nomes e sobrenomes dos autores da seguinte maneira: iniciais dos nomes (com ponto), seguidos do primeiro sobrenome completo, sem títulos acadêmicos nem cargos institucionais e separando cada autor com vírgula. O autor para correspondência deve identificar-se com um asterisco. Como pé de página deve indicar-se a origem institucional de cada autor incluindo endereço, cidade e país, e endereço de correio eletrônico do autor para correspondência.

#### Resumo e palavras-chave

Os artigos devem incluir um resumo em espanhol (ou português) e um em inglês, de no máximo 250 palavras. O resumo deve registrar brevemente todas as partes do documento: os propósitos do estudo ou pesquisa, materiais e métodos (seleção dos sujeitos do estudo ou animais de laboratório; métodos de observação e de análise), resultados e discussão (registrando informação específica ou dados e sua significação estatística sempre que for possível), e as conclusões principais. Deverão destacar-se as observações e aspectos mais novos e relevantes do estudo.

As palavras-chave (máximo quatro) são termos para indexação do artigo nas bases de dados e os termos de busca de Internet. Estas devem identificar o conteúdo do artigo e devem colocar-se depois do resumo em seu correspondente idioma. Para selecionar as palavras-chave do documento, sugere-se consultar e usar os descritores do Tesouro agrícola multilíngue Agrovoc, criado pela FAO, o qual abrange terminologia da agricultura, silvicultura, pesca, meio-ambiente e temas afins (<http://aims.fao.org/website/Search/sub>). Esta ferramenta permite selecionar as palavras-chave adequadas para que o artigo seja difundido de forma mais efetiva na Internet.

#### Introdução

Deve apresentar uma breve revisão dos trabalhos prévios relacionados com o tema por investigar e finalizar com a justificação e os objetivos da pesquisa. A introdução não deve incluir dados ou conclusões do trabalho que se está submetendo.

#### Materiais e métodos

Nesta seção devem descrever-se de forma clara, concisa e sequencial, os materiais (vegetais, animais, implementos de laboratório) utilizados no desenvolvimento do trabalho, além dos procedimentos

ou protocolos seguidos e do desenho experimental escolhido para o tratamento estatístico dos dados. A informação aqui registrada deve permitir a outros pesquisadores reproduzir o experimento de forma detalhada. Esta parte pode ter subtítulos e não deve incluir nenhum resultado nem discussão dos achados.

### Resultados

Nesta seção devem descrever-se os resultados em ordem lógica e de forma objetiva e sequencial, apoiando-se nas tabelas e figuras. Esta parte pode também incluir subtítulos e não deve discutir os dados apresentados.

### Discussão

A discussão deve ser uma síntese da confrontação dos dados obtidos no estudo com relação à literatura científica relevante que ademais interprete as similaridades ou os contrastes encontrados. Deverá focar visando a interpretação dos achados experimentais e não repetirá os dados apresentados na introdução nem a informação apresentada nos resultados. As seções correspondentes a resultados e discussão podem combinar-se em uma só.

### Conclusões

Nesta seção se relacionam os achados mais relevantes da pesquisa, isto é, aqueles que constituam um aporte significativo para o avanço do campo temático explorado, além de considerar um direcionamento sobre futuras investigações.

### Agradecimentos

Se necessário, podem ser feitos agradecimentos por contribuições importantes quanto à concepção, financiamento ou realização da investigação: financiadores, especialistas, firmas comerciais, entidades oficiais ou privadas, associações de profissionais e operários de campo e de laboratório.

### Tabelas

- Devem ser evitadas tabelas muito grandes. Se existirem muitos dados em uma tabela, recomenda-se dividi-la em duas ou mais.
- Cada tabela deve ter um título curto e explicativo na parte superior, sem abreviaturas.
- Não devem ser usadas linhas verticais para separar as colunas devendo, portanto, existir suficiente espaço entre elas.
- Qualquer explicação essencial para entender a tabela deve apresentar-se como uma nota na parte inferior desta.
- Os cabeçalhos de coluna devem ser breves, mas suficientemente explicativos.
- Cada tabela deve ter sido referenciada no texto.

### Figuras

- Os gráficos devem ser feitos em apenas uma cor com proporções de preto para as variações das colunas. As linhas das curvas devem ser na cor preta, pontilhadas ou contínuas usando as seguintes convenções: ▲, ■, ●, ◆, ◇, ○, □, △
- Em caso de fotografias ou mapas (originais ou escaneados) devem enviar-se em arquivos independentes, em formato tif ou jpg com mínimo 600 dpi de resolução e, adicionalmente, dentro de um arquivo MS-Word no qual seja incluído o título (curto e explicativo) na parte inferior.
- Da mesma forma que nas tabelas, devem numerar-se com números arábicos em forma consecutiva, e deve ser feita referência no texto a cada uma das figuras apresentadas.

### Nomenclatura

- As unidades devem expressar-se conforme o Sistema Métrico Decimal (SI).
- Os autores aceitarão as normas colombianas, bem como a vigente pelo *International Code of Botanical Nomenclature*, o *International Code of Nomenclature of Bacteria*, e o *International Code of Zoological Nomenclature*.

- Toda a biota (cultivos, plantas, insetos, aves, mamíferos, peixes, etc.) deve estar identificada em nomenclatura binomial (nome científico), exceto os animais domésticos comuns.
- Todos os medicamentos, biocidas e demais substâncias de uso comercial devem apresentar o nome de seu princípio ativo principal ou o nome genérico.
- Para a nomenclatura química serão usadas as convenções determinadas pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* bem como pela *Commission on Biochemical Nomenclature*.

### Referências

A citação de referências bibliográficas que sustentam frases dentro do texto deve seguir as normas de estilo do *Council of Science Editors* (CSE) algumas das quais se ilustram a continuação: dentro do texto se usará o sistema "autor(ões) an" se for um ou dois autores: (Jiménez 2009), (Pineda e Rodríguez 2010); se a publicação citada tiver três ou mais autores, cita-se o sobrenome do primeiro autor acompanhado da expressão latina *et al.*: (Bernard *et al.* 2003). Se forem citadas várias referências seguidas, deverão organizar-se em ordem alfabética, separadas por ponto e vírgula (;): (Hänsel e Gretel 1990; Hergé *et al.* 1983). Se o autor ou autores são citados diretamente no texto utiliza-se a mesma notação com o ano entre parênteses: Wagner (1982) encontrou que a água é vida, enquanto que Vivaldi e Pergolesi (1988) afirmam o contrário; os pesquisadores Magendie *et al.* (1845) descobriram que os cães têm quatro patas. As referências bibliográficas completas devem ir ao final do artigo em ordem alfabética de autores; se na lista de referências são citadas várias publicações do mesmo autor ou autores listam-se em ordem cronológica desde a mais antiga até a mais recente.

As contribuições que não preencham as normas de estilo bibliográfico serão devolvidas sem serem consideradas para avaliação.

Para obter mais exemplos sobre o sistema de citação do *Council of Science Editors* (CSE): <http://www.scientificstyleandformat.org/Tools/SSF-Citation-Quick-Guide.html>

#### • Livros

Gilman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P. 1990. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 8th ed. New York: Pergamon Press. 1811 p.

#### • Capítulos de livro

Diaz GJ. 2001. Naturally occurring toxins relevant to poultry nutrition. In: Leeson S, Summers JD editores. *Scott's Nutrition of the Chicken*. 4th ed. Guelph: University Books. p. 544-591.

#### • E-Book

Rollin, BE. 1998. *The unheeded cry: animal consciousness, animal pain, and science* [Internet]. Ames (IA): Iowa State University Press; [Citado 2008 agosto 9]. Disponível em: <http://www.netlibrary.com>.

#### • Artigo de revista

Hepworth PJ, Nefedov AV, Muchnik IB, Morgan KL. 2010. Early warning for hock burn in broiler flocks. *Avian Pathology* 39:405-409. Doi: 10.1080/03079457.2010.510500.

Nota: devem ser registradas as iniciais de todos os nomes dos autores. Para abreviaturas nome revistas: <http://www.efm.leeds.ac.uk/~mark/ISIabbr/>

#### • Artigo de revista eletrônica

Leng F, Amado L, McMacken R. 2004. Coupling DNA supercoiling to transcription in defined protein systems. *J Biol Chem* [Internet]. [Citado 2007 Jul. 24]; 279(46):47564-47571. Disponível em: <http://www.jbc.org/cgi/reprint/279/46/47564>.

Paswan VK, Sahoo A. 2010. Rumen metabolites and enzymatic profiles in crossbred cattle bulls fed on high and low levels of tanniniferous oak (*Quercus incana*) leaves. *Livestock Research for Rural Development* [Internet]. [Citado 2011 Mar. 22]; 22(11). Disponível em: <http://www.lrrd.org/lrrd22/11/pasw22207.htm>

### • Outras fontes de informação

#### Anais de eventos:

Cheeke PR. 2010. Agricultural and pharmaceutical applications of Chilean soapbark tree (*Quillaja saponaria*) saponins. In: 8th International Symposium on Poisonous Plants; 2009 maio 4-8, João Pessoa, Paraíba, Brasil, p. 38.

#### • Teses ou dissertações:

Murcia HW. 2010. Identificación funcional de citocromos involucrados en la biotransformación *in vitro* de aflatoxina B1 por medio de sustratos modelo e inhibidores específicos en cuatro especies de aves. [Tese de mestrado]. [Bogotá, Colombia] Universidad Nacional de Colombia.

### NORMAS DE ESTILO

- Deve ser redigido em voz passiva (avaliaram-se duas metodologias, e não: duas metodologias foram avaliadas) e em forma impessoal, isto é, terceira pessoa do singular (se encontrou, e não: encontrei ou encontramos).
- Quanto aos tempos verbais, o uso comum é o passado para a introdução, procedimentos e resultados, e o presente para a discussão.
- Em geral, recomenda-se evitar o uso do gerúndio. Fazer uso desta forma verbal apenas para indicar duas ações simultâneas; nos demais casos, redigir diferente a frase (substituir: um protocolo foi estabelecido, minimizando o efeito negativo..., por: se estabeleceu um protocolo com o qual foi minimizado o efeito negativo...).
- As letras itálicas são usadas para os nomes científicos (sistema binomial) e palavras ou expressões em idioma estrangeiro.
- O significado das siglas e abreviaturas deve explicar-se quando se mencionam pela primeira vez no texto. Posteriormente, se deve usar apenas a sigla ou abreviatura.
- As siglas não têm forma plural; esta é indicada nas palavras que as acompanham: as ONG, os ELISA.
- As abreviaturas do SI não devem ir com ponto, em plural ou em maiúscula: 1 kg, 25 g, 10 cm, 30 m, etc. As abreviaturas mais usadas nesta revista são as seguintes:

km quilômetro  
m metro

cm centímetro  
mm milímetro  
µm micrômetro  
nm nanômetro  
kg quilograma  
g grama  
mg miligrama  
µg micrograma  
ng nanograma  
l litro  
ml mililitro  
µl microlitro  
m mol  
M molar  
mM milimolar  
µM micromolar  
N normal

ppm partes por milhão  
( $1 \times 10^{-6}$ )  
ppb partes por bilhão  
( $1 \times 10^{-9}$ )  
cpm contas por minuto  
dpm desintegrações  
por minutos  
s segundos  
min minutos  
h hora  
SC subcutâneo  
Im. intramuscular  
IP intraperitoneal  
iv. intravenoso

- Entre o valor numérico e o símbolo deve ir um espaço:

35 g (não 35g),  $p > 12$  (não  $p > 12$ ); exceto para os sinais: %, +, - (os dois últimos quando indicam positivo e negativo). Exemplos: 99%, +45, -37.

- Em uma série de medidas, o símbolo vai ao final: fileiras a 3, 6 e 9 m, ou 14, 16 e 18%.
- A barra oblíqua (/) é um sinal linguístico que entre seus usos significa "por": três cães/gaiola, 4 pastilhas/dia, 2 l/recipientes, 10 frutos/galho. Um dos seus usos não linguísticos é expressar os quocientes de magnitudes e unidades de medida: 80 km/h, 10 ml/min, 10°C/h.
- Um dos usos não linguísticos do ponto (·) é indicar a multiplicação de duas quantidades, caso no qual se coloca separado delas e a meia altura:  $6 \cdot 3 = 18$ ;  $2 \cdot (x + y) = 30$ .
- O ponto (.) se usa para separar os milhares e a vírgula (,) se usa para separar decimais.
- As unidades baseadas em nomes se usam em minúsculas: um siemens (com algumas exceções como quando o símbolo deriva de um nome próprio: °C, grau Celsius).

### CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

**Autoria.** Considera-se autor àquela pessoa que tenha realizado uma contribuição direta e substancial no conteúdo do manuscrito. Esta contribuição deve incluir sua participação em aspectos como a concepção do ensaio e do desenho experimental, a obtenção dos dados de campo, a análise dos dados e a interpretação dos resultados, a aplicação do modelo estatístico apropriado, a redação do manuscrito e a pesquisa bibliográfica associada. Cada autor deverá estar em capacidade de explicar sua participação direta na publicação e de sustentar o seu conteúdo junto ao Comitê Editorial, caso seja requerido. A inclusão de autores honorários (contribuição autoral imprópria) é considerado um comportamento não ético.

**Submissão de manuscritos.** Os documentos submetidos para avaliação e possível publicação não deverão ser apresentados simultaneamente a outra revista (ou revistas). Isto invalida sua originalidade e compromete os direitos sobre sua publicação.

**Integridade da pesquisa.** A fabricação ou falsificação de resultados através da manipulação de equipamentos, materiais ou processos de pesquisa, a mudança ou omissão de dados e resultados, o plágio (menção dos resultados próprios ou de outros sem fazer o devido esclarecimento conforme as normas de citação bibliográfica) ou a publicação fragmentada (submeter fragmentos de uma pesquisa na forma de artigos independentes), são comportamentos não éticos e inaceitáveis.

**Conflito de interesses.** Os autores deverão declarar não ter relações de interesse comercial ou pessoal dentro do marco da pesquisa que levou à produção do manuscrito submetido.

**Reconhecimentos.** Devem ser descritos os tipos de apoio recebidos tais como financiamento, patrocínios, bolsas ou fornecimento de equipamentos, entre outros.

**Avaliação de artigos.** Os avaliadores só aceitarão revisar artigos manuscritos cujo tema seja de seu completo domínio. Espera-se uma opinião objetiva do ponto de vista acadêmico e científico, desprovida de condicionamentos pessoais. Durante todo o processo, o avaliador conservará a confidencialidade total do conteúdo do manuscrito e não deverá transferir a responsabilidade designada a um terceiro (copesquisador, estudante de pós-graduação ou outros). Se durante o período de revisão o avaliador considera que tem qualquer impedimento de tipo ético ou conflito de interesses deverá interromper a avaliação e assim comunicar ao Comitê Editorial.





Revista de la  
Facultad de **Medicina Veterinaria**  
y de **Zootecnia**

© Universidad Nacional de Colombia, 2021