

01621
39



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

RELACIÓN DE LA PRUEBA DE WISCONSIN
CON EL CONTENIDO DE CÉLULAS SOMÁTICAS
Y LA PRODUCCIÓN DE LECHE EN LAS CABRAS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A N :
VÍCTOR HUGO LEÓN FLORES
SERGIO SÁNCHEZ ISLAS

ASESORES:
M.C. MIGUEL ÁNGEL PÉREZ RAZO
M.C. OSCAR CHAVEZ RIVERA

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2003

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



SECRETARÍA GENERAL
DE EDUCACIÓN PÚBLICA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Relación de la prueba de Wisconsin con el contenido

de células somáticas y la producción de leche en las
cabras."

que presenta el pasante: León Flores Víctor Hugo
con número de cuenta: 9754302-0 para obtener el título de:
Médico Veterinario Zootecnista.

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 24 de Octubre de 2007

PRESIDENTE Dr. Guillermo Tomás Oviedo Fernández *G. Oviedo T.*

VOCAL MSP. Jesús Carlos Manzano Cufas *J. Manzano Cufas*

SECRETARIO M.C. Miguel Ángel Pérez Razo *M. Pérez Razo*

PRIMER SUPLENTE MVZ. Raúl Radillo Rodríguez *R. Radillo Rodríguez*

SEGUNDO SUPLENTE MVZ. Ma. Guadalupe Mondragón Olvera *M. Guadalupe Mondragón Olvera*

13



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
 P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Relación de la prueba de Wisconsin con el contenido
 de células somáticas y la producción de leche en las
 cabras"

que presenta el pasante: Sánchez Islas Sergio
 con número de cuenta: 8811418-7 para obtener el título de :
Médico Veterinario Pootecnista.

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E
 "POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 24 de Octubre de 2002

PRESIDENTE Dr. Guillermo Tomás Ovidio Fernández. G. Ovidio Fz.

VOCAL MSP. Jesús Carlos Muntano Cañe. J. C. Muntano

SECRETARIO M.C. Miguel Ángel Pérez Razo. M. Pérez

PRIMER SUPLENTE MVZ. Raúl Radillo Rodríguez. R. Radillo

SEGUNDO SUPLENTE MVZ. Ma. Guadalupe Mondragón Olvera. M. G. Mondragón

C

DEDICATORIA.

A la memoria de mi Madre : Gracias por todos los consejos y por todo lo que me enseñaste y por lo cual siempre estarás conmigo.

Victor Hugo

A mi papá y a mis hermanos que me apoyaron incondicionalmente

A todos los profesores que contribuyeron a mi formación, en especial al M.C. Miguel Ángel Pérez Razo. por el apoyo para la realización de este trabajo.

Gracias

Victor Hugo

E

A mi papá mi mamá y a mis hermanos.

A todos los profesores que contribuyeron en mi formación.

Gracias

Sergio

F

ÍNDICE

	Pág.
1. RESUMEN.	1
2. INTRODUCCIÓN.	3
3 REVISIÓN DE LA LITERATURA.	5
3 1. Población caprina mundial	5
3.2. Población caprina en México.	5
3 3. Mecanismos de defensa en la ubre de la cabra.	6
3 4. Conteo de Células somáticas (CCS)	8
3 5 Factores que afectan el CCS	9
3 5 1 Forma de secreción de la glándula mamaria.	9
3 5 2 Relación de las células somáticas con la presencia de mastitis.	10
3 5 3 Células somáticas y presencia de bacterias	14
3 5 4 Genética y su relación con CCS	15
3 5 5 Diferencias raciales	15
3 5 6 Período de estimación	16
3 5 7 Producción de leche	16
3 5 8 Período de lactancia y estación del año.	16
3 5 9 Calidad de la leche	19
3 5 10 Tipo de nacimiento	19
3 5 11 Otros factores	20
3 5 12 Estrés.	20

3.6 Métodos de diagnóstico de mastitis	20
3.6.1 Conteo de células en la leche y su interpretación.	21
3.6.2 Prueba de Wisconsin.	22
3.6.3 Microscopia directa.	22
3.6.4 Conteo de células somáticas utilizando método PYMG (verde de pironina g-metil)	23
4 OBJETIVOS	24
5 MATERIALES Y MÉTODOS	25
5.1 Localización.	25
5.2 Colección de muestras	25
5.3 Prueba de Wisconsin	26
5.4 Contador fluorescente de células somáticas.	26
5.5 Análisis estadístico	28
6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	30
7 CONCLUSIONES.	36
8 LITERATURA CITADA.	37

1. RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue analizar la relación de la prueba de Wisconsin con el contenido de células somáticas y la producción de leche en las cabras para lo cual se realizaron tres estudios los cuales consisten en lo siguiente. en el primero se determina la correlación entre las lecturas obtenidas en la prueba de Wisconsin con las obtenidas en el Fossomatic. en el segundo estudio se analizaron algunos factores (periodo de lactancia, tipo de parto y edad) y se compararon con respecto al conteo de células somáticas obtenidas mediante Fossomatic y en el tercer estudio la producción de leche obtenida durante un periodo de 9 meses de las cabras fue analizada utilizando como covariables el tipo de parto y la edad de la cabra y como efectos fijos se utilizaron el periodo de lactancia y la lectura de Wisconsin. El trabajo se realizó en las instalaciones del rancho Cuatro Milpas ubicado en el Km 44 de la carretera México - Querétaro, Edo de México. Se utilizaron 35 cabras de la raza Alpina en diferentes etapas de lactación. los animales se encontraban bajo régimen estabulado. La ordeña se realizó en forma manual previa desinfección con solución yodada una vez por semana por las tardes. Se midió la producción individual, posteriormente se hacía la prueba de Wisconsin y se enviaban muestras para su conteo celular por medio de método Fossomatic para lo cual estas eran calentadas a 40°C en baño María para después procesarlas automáticamente. El análisis estadístico se realizó mediante el PROC CORR del paquete estadístico SAS (SAS Inst. Users Guide, 1998). En el primer estudio se observó una correlación significativa de 0.77 entre la lectura de Wisconsin y el conteo celular por Fossomatic. En el segundo estudio

el efecto del periodo de lactancia sobre el conteo de células somáticas (CCS) fue significativo ($P < 0.001$) los menores conteos celulares se registraron en el periodo de 91-180 días y los mayores durante el periodo de más de 305 días de lactancia. El efecto del tipo de parto tuvo influencia estadística significativa sobre el CCS ($P < 0.001$) los mayores conteos celulares se observaron en hembras con una cría, en relación a las de 2 o más crías al parto también la edad presentó una correlación significativa ($P < 0.001$) los conteos mayores se observaron en hembras con edades superiores. En el tercer estudio, las covariables edad de la cabra y tipo de parto mostraron influencia significativa sobre la producción de leche ($P < 0.01$). Las betas obtenidas, fueron positivas y muestran que por cada unidad de aumento en la edad de la cabra la producción de leche se incrementó en 0.05 y que por cada unidad de aumento en el número de crías la producción de leche también fue incrementada en 0.093. Se encontró una interacción significativa entre las lecturas de Wisconsin con el periodo de lactancia ($P < 0.001$). La producción de leche fue mayor en las cabras que no mostraron en algún momento una lectura de 4.5 a 5 de Wisconsin, en comparación con cabras que si presentaron por lo menos una o más lecturas, esta relación con excepción del primer periodo de lactancia (1-50) se observó en todos los periodos.

2 INTRODUCCION

El interés en la investigación de la producción y la composición de la leche de las cabras en México se ha venido incrementando recientemente, ello se debe a la iniciación de programas de cría y también a la cada vez más creciente intensificación e interés en los sistemas de producción caprinos (Arbiza y De Lucas, 2001)

Sin embargo, en el caso particular de la producción láctea caprina pocas medidas de salud se han establecido en las pruebas de control en los rebaños, sobre todo en lo que se refiere a mastitis y por ende a la calidad de la leche. En este sentido la inclusión de algunas pruebas que indiquen daños en la ubre, podría contribuir a disminuir la incidencia de mastitis en los rebaños y por consiguiente ayudar a minimizar las pérdidas en la producción de leche y poder asegurar un alto estándar de calidad y seguridad del producto (Zeng, 1996)

Entre las pruebas que se han utilizado para determinar el estado sanitario de la ubre en bovinos la mayoría de ellas se fundamenta en la detección de linfocitos, clasificándose a estas pruebas según la forma de cuantificación de células en semicuantitativas (Wisconsin, California) o cuantitativas (Fossomatic, microscopia directa). No obstante también utilizadas en los hatos caprinos, no siempre los resultados obtenidos de estas pruebas se pueden homologar con los ya obtenidos en vacas para diagnosticar mastitis (Zeng, 1996).

Por otro lado las altas lecturas de células somáticas que ocurren en la leche de cabra, aún en ausencia de mastitis es debida a que existen otros factores (periodo de lactancia, tipo de parto, edad, etc.) que pueden influir en la presencia de células somáticas en la leche (Lerondelle *et al.*, 1992). En consecuencia el presente trabajo pretende estudiar algunos factores que influyen en la medición de células somáticas en la leche de cabras y establecer su relación con la producción de leche.

3 REVISIÓN DE LA LITERATURA

3.1. Población caprina mundial.

La población mundial de cabras se ha estimado en aproximadamente 738 246.214 cabezas (FAO, 2001), las cuales están distribuidas de la siguiente forma en África 218 625 449, Asia 465 198.053, Sudamérica 22 147 552, Europa 17.903 635, América Norte y Centro 13 687 896 y Oceanía 683,629. Como se puede apreciar por su distribución la mayoría de las cabras se localizan en los países en vías de desarrollo situados en las regiones tropicales, áridas o semiáridas (Arbiza y de Lucas, 2001). Con todo esto las cabras aportan a nivel mundial 3 759 040 Toneladas de carne y una producción láctea de 12.455 044 toneladas (FAO, 2001);

3.2. Población caprina en México.

En la actualidad México tiene una población de 9,100 000 animales (FAO 2001), de los cuales el 16% se localiza en Puebla, 12 % en Oaxaca, 11% en San Luis Potosí, 8% en Guerrero, 6% Zacatecas, 5% en Nuevo León (SAGARPA, 1999).

En nuestro país la leche de cabra es importante desde el punto de vista social ya que representa un medio de ingreso y fuente de alimentos para numerosas familias campesinas principalmente en las zonas áridas y semiáridas del norte de

nuestro país. en la tabla 1 se aprecia la producción de leche de cabra por estado (millones de litros)

3.3. Mecanismos de defensa en la ubre de la cabra.

La glándula mamaria utiliza varios mecanismos distintos de defensa. En la hembra no lactante, el orificio de la tetilla permanece ocluido por un tapón de queratina que no permite entrar a las bacterias. Cuando la hembra está lactando, el efecto de eyección de la leche ayuda a impedir la invasión de algunos patógenos potenciales, aparte de la presencia de inhibidores bacterianos en la leche misma: las lacteninas. Estas incluyen el complemento, la lisozima, una proteína captadora de hierro llamada lactoferrina y una enzima, la lactoperoxiidasa. La lactoferrina compete con las bacterias por el hierro y, por esa razón, impide que los microorganismos dispongan de él para su desarrollo (Tizard, 2002).

Otro mecanismo de defensa lo constituyen algunos elementos provenientes de la sangre y que ya en la leche se les ha denominado como células somáticas: macrófagos, neutrófilos, polimorfonucleados (PMN) y linfocitos, los cuales juegan un papel esencial en los mecanismos de defensa de la glándula mamaria.

Los neutrófilos pueden constituir del 50 al 70 % del conteo celular somático (CCS) en cabras libres de infección intramamaria, mientras que en las vacas estas cifras oscilan entre el 5 y 20 %. Al contrario que la leche de vaca, el conteo celular en la

Tabla 1. Producción de leche de caprino en México (millones de litros)

	1996	1997	1998	1999	2000	2001*
Aguascalientes	0.0	0.0	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Baja California	0.0	0.2	0.2	0.3	0.3	0.3
Baja California Sur	1.6	2.1	3.4	3.9	3.3	2.1
Campeche	0.0	0.0	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Coahuila	42.0	38.9	40.7	45.7	42.8	52.1
Colima	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Chiapas	0.0	0.0	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Chihuahua	3.8	2.4	3.8	4.6	4.6	4.6
Distrito Federal	0.0	0.0	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Durango	19.3	20.0	22.2	23.6	24.3	29.5
Guanajuato	23.2	21.0	23.5	23.6	23.7	24.4
Guerrero	2.4	3.1	3.6	3.6	3.5	N.S.
Hidalgo	1.0	2.8	0.8	0.6	0.6	0.5
Jalisco	9.0	6.1	6.0	5.0	6.3	5.2
México	0.0	0.0	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Michoacán	3.6	3.6	3.4	3.5	3.6	3.6
Moravia	0.0	0.0	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Nayarit	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.0
Nuevo Léon	0.6	1.7	5.7	5.0	5.5	5.5
Oaxaca	0.0	0.0	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Puebla	1.2	1.0	1.2	1.2	1.2	1.3
Queretaro	1.3	1.1	0.9	0.9	1.0	0.8
Quintana Roo	0.0	0.0	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
San Luis Potosí	0.6	0.4	5.0	3.7	3.3	3.1
Sinaloa	0.0	0.0	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Sonora	0.0	0.5	0.5	0.6	0.5	0.5
Tabasco	0.0	0.0	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Tamaulipas	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Tlaxcala	0.6	0.7	0.6	0.6	1.2	1.4
Veracruz	0.3	0.3	0.4	0.7	0.6	1.2
Yucatán	0.0	0.0	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Zacatecas	4.0	4.2	3.0	5.1	4.4	4.5
Total	122.9	120.5	127.7	131.0	131.2	139.9

* NS No significativo

Fuente: 2001* preliminar Sistema de Información y Estadística Agroalimentaria y
Pescuera (SIAP) SAGARPA. Última actualización: 20/02/02

leche de cabra se incrementa en el estado de lactación y parición (Paape y Capuco 1997).

Muchas investigaciones en infecciones mamarias han sido basadas en los CCS en la leche pero sólo algunos hacen referencia a los tipos celulares. Es conocido que la presencia de leucocitos (principalmente polimorfonucleares) en leche es proporcional al grado de daño o infección lo cual constituye un método indirecto para la detección de infecciones mamarias especialmente mastitis subclínicas (Rota *et al.* 1993)

Los neutrófilos exhiben migración directa hacia los mensajeros químicos producidos por los organismos, produciendo acumulación de neutrófilos en la leche (Paape y Capuco, 1997) Por lo que consecuentemente una infección en la glándula puede estar relacionada con un aumento en el número de células somáticas que aparecen en la leche y se les ha utilizado por lo mismo como un signo del grado de inflamación de la glándula mamaria (mastitis)

3.4. Conteo de células somáticas (CCS).

Los conteos de las células somáticas en leche de cabra han sido indicados como superiores a los observados en la leche de vaca. A través de esto es reconocido que el incremento en el conteo de células en la leche de vaca resulta en decremento de la producción láctea, no hay ninguna evidencia para indicar que

esta situación exista en la producción de leche de cabra o que varios factores contribuyen a este conteo celular elevado

En ganado bovino se sabe que un promedio de células somáticas en la leche de animales libres de infección intramamaria varía de 40 a 80 x 10³ células/ml mientras que en las cabras, también libres de infección las cuentas observadas generalmente son mayores, con rangos que van de 750.000 a 5,4 millones de células por mililitro (Park y Humphrey 1986, Paape y Capuco, 1997).

3.5. Factores que afectan el CCS.

Algunos estudios en cabras y en ovejas han indicado que en adición a infecciones mamarias existen otros factores que también influyen en la composición celular de la leche, el conocimiento de estos puede servir para comprender más correctamente la interpretación de la ubre sana (Rota *et al.*, 1993). La reacción inflamatoria propicia la llegada de células fagocitarias activas en especial neutrófilos y la exudación de proteínas séricas

3.5.1. Forma de secreción de la glándula mamaria.

La secreción de la leche en la cabra es apócrina comparada a la merocrina de vaca que resulta en el aumento de partículas citoplasmáticas anucleadas en la leche. Las partículas citoplasmáticas son similares en tamaño a los leucocitos en la leche (5 a 30 nm), ellas contienen proteína, lípidos y micelas de proteína. Estas

partículas son el producto de el proceso normal de secreción de la leche. Las partículas citoplasmáticas están dentro del rango del tamaño de células somáticas normalmente encontradas en la leche de cabra por lo que pueden ser equivocadamente contadas como células somáticas enmascarando y dificultando la interpretación de la respuesta leucocitaria a la infección. su diferenciación es importante en el diagnóstico de la mastitis subclínica. Métodos de identificación leucocitaria usualmente son basados en la identificación de núcleos lo que explica en algo el porque en la leche de cabra aparece un mayor número de partículas citoplasmáticas y de células epiteliales, sin que ocurra en ese momento mastitis (Park y Humphrey 1986)

3.5.2. Relación de las células somáticas con la presencia de mastitis.

Las células somáticas, como ya se hizo mención juegan un papel importante como mecanismos de defensa en la glándula mamaria y debido a que su aumento esta generalmente relacionado a la presencia de microorganismos, se les ha utilizado como un aspecto importante en el diagnóstico de infecciones intramamarias subclínicas. Los conteos celulares diferenciales (CCD) además de los CCS a menudo se les emplea para distinguir las variaciones celulares fisiológicas de las variaciones celulares patológicas por lo que en las vacas se les ha utilizado como un reflejo del estado de salud de la glándula (Cuccuru *et al* 1997)

En las vacas el CCS ha sido aceptado como un indicador de la condición de mastitis, observándose que se requieren cifras arriba del orden de 750 000 x ml,

para considerarlas como indicadoras de mastitis, o bien por abajo de ellas para considerar a las hembras como sanas (Paape y Capuco, 1997). En las cabras esta misma lectura en el conteo celular somático, no necesariamente es indicador de mastitis

Valores de CCS de más de un millón de células somáticas por mililitro en la leche de la cabra, se pueden encontrar, como se aprecia en el cuadro 1, en cabras sin problemas de mastitis

Cuadro 1. Conteo de células somáticas en cabras sin problemas de mastitis

Individual	Número de CS / ml	Referencia
	750 000 - 5 4 X 10 ⁶	Dulin <i>et al.</i> , 1983
	9.08 X 10 ⁵	Park y Humphrey, 1986
	6.16 X 10 ⁵	Zeng <i>et al.</i> , 1997
	1 X 10 ⁶ en 17 % de las muestras	Zeng <i>et al.</i> 1997
En Tanque	1 X 10 ⁶ ml ⁻¹	Zeng y Escobar, 1996
	360 000 - 880 000 / ml ⁻¹	Manser citado por Wilson <i>et al.</i> , 1995
	1.32 X 10 ⁶	Droke <i>et al.</i> , 1993.

Ha este respecto, se ha mencionado que el 90 % del conteo celular somático en las cabras no necesariamente obedece a una infección bacteriana intramamaria y que puede haber otros factores que contribuyan al conteo celular (Wilson *et al.*, 1995)

En E.U.A. los límites legales de conteo de células somáticas en un tanque de leche de cabra se han establecido que no deben ser arriba de 10^6 /ml¹. No obstante que como ya se hizo mención esta medida puede ser un tanto incierta ya que como lo encontraron Droke *et al.*, (1993) en su estudio más del 60 % de las cabras sanas mostraron conteos arriba de 5×10^4 . Hallazgos similares han sido mencionados por Dulin *et al.*, (1983) y Contreras *et al.* (1999)

Recientemente una revisión del papel de el CCS en leche de las cabras se discutió en detalle. Investigaciones previas en cabras con ubres sanas, otras infectadas con *Staphylococcus* *cuagulasa-negativa* y otras infectadas con patógenos mayores mostraron promedios geométricos de 270 000, 932 000 y 2 413 000 CS/ml respectivamente demostraron la importancia de el CCS en el diagnóstico de la infección de la ubre (Poutrel *et al.*, 1994 citado por Galina *et al.*, 1996)

Numerosos estudios realizados entre 1994-1995 en 1000 cabras de Poitou (Charentes realizado por el instituto de criadores o productores, el INRA, la Cámara de Agricultura y el CNEV de Niort, mostraron que la principal causa de aumento del conteo celular es la infección de la glándula por un microorganismo.

Al comparar un gran número de cabras, los resultados de los análisis bacteriológicos (presencia y naturaleza de microbios) de su leche y el número de células encontrados éstos, fue observado que el conteo celular de la leche de cabra era un buen indicador del nivel de infección de la glándula

Es por esta relación significativa entre el estado infeccioso de la glándula y el conteo celular, que en lugar de hacer regularmente los análisis bacteriológicos de la leche que son muy costosos y delicados para realizarse, se utiliza el criterio células de la leche que es fácil de utilizar para hacer el diagnóstico de salud de la glándula mamaria

Los valores de referencia que se darán más adelante permiten establecer a partir del conteo de células de la cabra un diagnóstico del estado infeccioso de su glándula mamaria

El resultado será verdadero alrededor de 75% entonces diremos que el animal está presumiblemente sano o infectado (existe un cierto margen de error, depende de la especificidad y sensibilidad del examen).

Es necesario tener varios conteos celulares individuales y mensuales (se necesita una serie de valores). Estas referencias solo sirven para establecer un diagnóstico para un animal y no para un rebaño (cuadro 2).

Cuadro 2 Ejemplo para una cabra, con al menos tres conteos celulares:

-Si el conteo es superior a 750 000 cel/ml.	Sana presumiblemente
-Si al menos 2 conteos son superiores a 750 000 cel/ml.	Presumiblemente infectada por Patógenos menores.
-Si al menos 3 conteos son superiores a 750 000 cel/ml	Presumiblemente infectada por patógenos mayores

L' eleveur de Chèvres1998.

3.5.3. Células somáticas y presencia de bacterias.

El número de organismos patógenos en la leche puede servir de indicador cuantitativo de inflamación de la glándula mamaria. Porque el CCS no revela la mastitis en la leche de cabra, sería deseable comparar o correlacionar CCS con el número de células bacterianas.

Aunque la tendencia de las cabras lecheras es tener una más baja incidencia de infección intramamaria que las vacas hay similitudes en el predominio de patógenos de la mastitis que afectan los rebaños de las cabras y de las vacas, con excelente control de mastitis. Aunque el Staphylococcus aureus puede ser el

patógeno más común de la mastitis en cabras *Staphylococcus cuagulasa-negativa* (*S. Caprae*, *S. Xylosus*, *S. Sciuri*, *S. Lentus*, (Jonsson, P. and Wadstrom, T. 1993) son los patógenos de mastitis que más prevalecen en los rebaños de cabras y en rebaños de vacas con excelente control de la mastitis se ha descrito este grupo de patógenos como oportunistas y difícil de controlar por los procedimientos de control de mastitis normales (Fox *et al.*, 1992).

3.5.4. Genética y su relación con CCS.

El mejoramiento genético en el contenido de células somáticas ha sido poco estudiado por los productores debido a que se ha observado una relación negativa entre la producción de leche y el CCS. Las vacas altas productoras tienden a presentar bajos conteos de células somáticas. Condiciones medioambientales que llevan a bajar el CCS tienden a aumentar la producción y la relación bastante fuerte para superar las correlaciones genéticas adversas de producción y CCS (Cassell, 1994).

3.5.5. Diferencias raciales.

Existe discrepancia en cuanto si ocurren diferencias raciales en el conteo de células somáticas algunos autores no mencionan variación por este efecto (Park y Humphrey, 1986), mientras que otros si lo indican, por ejemplo Zeng *et al.* (1996), menciona que la raza Alpina presentó un mayor rango en CCS en comparación con la Nubia

3.5.6. Periodo de estimación.

En el estudio de Zeng *et al.* (1997), se señala que mediciones del CCS en forma diaria no fueron lo eficientemente adecuadas para estimar las condiciones de mastitis en las cabras y que los registros de reportes consecutivos mensualmente podían ser usados para establecer la condición de salud y producción de leche y contribuir o ayudar en los tratamientos con antibióticos y las decisiones de descarte

El número de veces que una cabra fue asociada con un conteo celular alto estuvo relacionado con la presencia de bacterias (Wilson *et al.*, 1995).

3.5.7. Producción de leche.

En ganado bovino existen varios estudios en donde se señala la variación en la producción de leche y los CCS, sin embargo en otras especies no ha sido del todo dilucidado

3.5.8. Periodo de lactancia y estación del año.

En el trabajo de Park y Humphrey (1986), en un rebaño caprino, se refiere un CCS para el inicio y mitad de la lactancia de 1.404×10^5 células/ml y 6.14×10^5 células/ml respectivamente. En otras especies como el caso de ovinos se ha detectado influencia del estado de lactación sobre el contenido de células

somáticas, señalando que las cuentas celulares incrementaron desde el día 75 hasta el final de la lactación entre un 30 y 35%

La variabilidad de CCS en cabras libres de mastitis ha sido igualmente mostrada (Aleandri *et al.*, 1994 citado por Galina *et al.*, 1996), por algunos meses al final de la lactación normal de las cabras la leche estuvo por arriba de 6 602 000 y 8 974 000 CCS en rebaños de razas de Saanen y Alpinas en Italia. Otro trabajo durante los 5 primeros meses de lactación mostraron que el promedio de CCS de la ordeña por la tarde fue 50% más alto que en la mañana. Esto fue probablemente relacionado a la producción de leche siendo 35 % menor a la ordeña de la mañana (Dulin *et al.*, 1983). Los animales sanos al inicio del periodo de lactación tienen un más alto conteo celular que durante el pico de la lactación, el CCS incrementa progresivamente después de el pico de lactación. Otros estudios señalan que el porcentaje del CCS presentó variaciones entre meses mencionando diferencias que van de 1 2 5 a 1 10 con un conteo de 200 000 a 500 000 células/ml en el principio de la lactación, 200 000 a 350 000 en el pico de la lactación y un incremento progresivo de 1 000 000 a 3 100 000 o más células al final. Otro trabajo también mostró un progresivo CCS en algunas cabras de la primera a la cuarta lactación (Rota *et al.*, 1993; Galina *et al.*, 1996).

El CCS incremento de acuerdo al mes del año, al igual que el estado de la lactación, los mayores conteos se observaron en los meses de otoño y principios de invierno. Probablemente debido al mayor avance de la lactación (Wilson *et al.*, 1995). Resultados similares también fueron encontrados en el estudio de Zeng y

Escobar (1995). este último estudio refiere una correlación de 0.55 con CCS y el estado de la lactación

De manera diferente a como sucede en las vacas en las cabras el CCS no es afectado por el estado de lactancia y parición (Paape y Capuco *et al.*, 1997). En contraste las cabras un periodo seco no parece necesario para optimizar la producción de leche

En general, los estudios realizados en las cabras muestran que la producción de leche en los primeros tres meses de lactación es más grande que la de los otros meses.

Las muestras de leche en el primer mes después de la parición fueron más altas en grasa, proteína, sólidos no grasos, sólidos totales y células somáticas que en posteriores etapas de la lactación, excepto en las últimas etapas donde el contenido de células somáticas se incrementó que en este estudio correspondieron a la semana 13-21 de lactación (Zeng *et al.*, 1996).

En este trabajo encontraron una correlación positiva significativa entre el porcentaje de proteína con CCS. Esta significativa correlación probablemente como mencionan estos autores indican que conforme la producción de leche declina con el tiempo en la lactación, el contenido de células de la leche incrementa (Park y Humphrey, 1986; Zeng y Escobar, 1995)

3.5.9. Calidad de la leche.

El CCS estuvo correlacionado negativamente con el porcentaje de grasa, proteína, lactosa y la producción de leche 0.41, 0.23, 0.36 y 0.46, respectivamente (Zeng y Escobar, 1995). Hallazgos similares han sido reportados en vacas según Gill *et al.*, 1990 citado por Zeng y Escobar, 1995.

El incremento del número de parto y bajo contenido de materia seca en la leche estuvo asociado con un mayor CCS (Wilson *et al.*, 1995). El mayor número de lactancias se ha asociado en vacas con la presencia de mastitis.

3.5.10. Tipo de nacimiento.

El tipo de nacimiento en ovinos ha sido señalado como otro factor que influye sobre el conteo de células, aumentando en mellizos en comparación con los nacimientos sencillos (Gonzalo *et al.*, 1994). La lactancia o el estímulo de la ordeña induce directamente la migración de neutrófilos hacia tejido mamario. La ordeña remueve los neutrófilos comprometidos (pérdida de sus funciones fagocíticas y bactericidas), los cuales son reemplazados por neutrófilos sanos (Paape y Capuco *et al.*, 1997).

3.5.11. Otros factores.

La vacuna contra enterotoxemia y una accidental sobre alimentación de granos seguida de una acidosis media puede estar asociada con un incremento en las células somáticas (Wilson *et al.*, 1995)

Hinckley citado por Zeng y Escobar (1995) reporta que el 56% de las cabras en lactación produjo leche con 1×10^5 CCS y en el estudio de Zeng y Escobar (1995) el 51% de las muestras resultaron en más de 1×10^6 de CCS ml^{-1} y mostraron solo trazas de patógenos de mastitis

3.5.12. Estrés.

Las muestras histológicas de cultivos frescos de ubre, no mostraron diferencias en el tejido de hembras evaluadas, no indicando daño en el tejido de la ubre en CCS de 3.3×10^6 células ml^{-1} (Zeng y Escobar 1995) No se ha notado que el estrés aumente el número de CS (Wilson *et al.*, 1995)

3.6. Métodos de diagnóstico de mastitis.

La mayoría de los métodos empleados en el diagnóstico de mastitis sobre todo subclínicas en ganado bovino, se basan en la determinación y/o cuantificación de leucocitos en la leche. Variando en la precisión, rapidez, facilidad y en los costos de su operación

Comúnmente en la leche de la cabra las partículas que no son leucocitos no contienen DNA por lo que los métodos específicos para contar DNA dan normalmente resultados más precisos que los dados por el contador electrónico de células o microscopia directa, pero con una tinción no específica para DNA. También se ha observado en la cabra que algunas de estas partículas pueden contener fragmentos nucleares y el por que de su presencia en la leche, se desconoce (Paape y Capuco *et al.* 1997)

En consecuencia únicamente los métodos específicos para DNA son los más empleados para estimar células somáticas en cabras (Dulin *et al.* 1983, Poutrel y Lerondelle 1983)

3.6.1. Cuento de células en la leche y su interpretación.

Es el conteo de células epiteliales de la glándula mamaria y sobre todo de los glóbulos blancos presentes en gran cantidad en caso de infección de la glándula. A decir conteo, concentración o nivel celular, nos estaremos refiriendo a el número de células/ml de leche.

El conteo celular de la leche puede ser realizado por dos métodos:

- Con el microscopio - es el método de referencia, permite verificar la calibración del aparato de conteo electrónico. Se cuentan las células observadas en el

microscopio Este método (muy específico) es utilizado en los experimentos y no en los estudios rutinarios de laboratorio

2 Con un aparato electrónico.- el FOSSOMATIC, que cuenta los núcleos de las células fluorescentes Este método es utilizado en Francia por los laboratorios de análisis de leche Sólo las células nucleadas son contabilizadas con este método

3.6.2. Prueba de Wisconsin.

Esta prueba constituye una prueba objetiva y lo suficientemente sensitiva y barata como para considerarse en un programa para el diagnóstico rutinario de la mastitis subclínica en ganado bovino, pero en el caso particular de la especie caprina la prueba requiere todavía de más información, para poder determinar su grado de uso en esta especie

Esta prueba mide la cantidad de células somáticas que se encuentran presentes en la leche

3.6.3. Microscopia directa.

Este método es el más sencillo de todos aunque algo tardado sin embargo, es el que más se ha utilizado como base para garantizar los resultados de los otros métodos El procedimiento implica la tinción de las células con verde de pironina grametria cual permite diferenciar las células que contienen DNA (linfocitos) con

las partículas citoplasmáticas que contienen RNA y que de no hacerlo implicaría errores en la lectura (Droke *et al.*, 1993)

El estándar internacional lo especifica como el método de referencia en el conteo de células somáticas en leche cruda y leche químicamente preservada (Anexo1).

3.6.4. Conteo de células somáticas utilizando método PYMG (verde de pironina g-metil).

En leche de cabra hay un gran número de partículas citoplasmáticas como células debido a al sistema secretor apócrino en cabras lecheras. Las partículas citoplasmáticas carentes de núcleo y DNA, por lo tanto no son consideradas como células ni como leucocitos.

Los datos del conteo de células somáticas de la mayoría de las muestras de leche de cabra son convencionalmente obtenidas de instrumentos calibrados con los estándares de leche de vaca. Esto ha sido un considerable desacuerdo acerca de la certeza de los métodos utilizados para la determinación del conteo de células somáticas en leche de cabra. Otros factores como las pruebas de laboratorio, almacenaje y envío de muestras pueden también afectar los resultados finales. Lintner *et al.* 1987 citado por Zeng *et al.* 1999 enfatizo la necesidad de comparar determinaciones de conteo de células somáticas por diferentes métodos de conteo celular así como la repetibilidad en el laboratorio (Zeng *et al.* 1999)

4 OBJETIVOS

- El interés de este estudio es investigar la variación en el contenido de células somáticas, prueba de Wisconsin y su relación con la producción de leche en cabras durante toda la lactancia
- Determinar la relación entre la prueba de Wisconsin y el conteo celular somático mediante el método Fossomatic
- Determinar el efecto de la edad, tipo de parto, período de lactancia y lectura de Wisconsin sobre el contenido de células somáticas en la leche de cabra.
- Determinar el efecto de la lectura de Wisconsin y el período de lactancia sobre la producción de leche en cabras Alpinas

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Localización.

La parte experimental de este estudio se realizó dentro de las instalaciones del rancho Cuatro Milpas ubicado en el Km 44 de la carretera México - Querétaro Edo de México. Se localiza entre los 19° 38' y los 19°47' de latitud norte y entre los 99°11' y los 99°25' de longitud oeste, y a 2200 m.s.n.m. El clima predominante donde se encuentra la explotación es templado húmedo con lluvias en verano.

Se utilizaron 35 cabras de la raza Alpina en diferentes etapas de lactación. Los animales se encontraban bajo régimen estabulado y su alimentación consistió de una ración en base a heno de alfalfa y sorgo (suministrado en forma de pellet) y suplementados con un concentrado comercial (16% de proteína). La ordeña se realizó en forma manual previa antisepsia con solución yodada.

5.2. Colección de muestras.

Se colectaron semanalmente y de la ordeña de la tarde, muestras de leche de cada uno de los medios de las cabras involucradas en el estudio, durante un periodo de 8 meses (32 muestreos X 35 cabras = 1,120).

5.3. Prueba de Wisconsin.

Se tomaron 50 ml. de cada uno de los medios de las cabras en ordeña en vasos desechables y se realizo posteriormente la prueba de acuerdo al siguiente procedimiento

- a) Colocar 3 ml de leche en los tubos especiales. Agregar 3 ml del reactivo por abajo de la superficie de la leche y tapar los tubos. Mezclar los tubos durante 15 segundos Después de mezclar dejar reposar 15 segundos
- b) Se invierten los tubos y en posición vertical se deja fluir la mezcla durante 15 segundos exactamente y se regresan los tubos a la posición normal
- c) Medir exactamente la mezcla sobrante e interpretar los resultados. que pueden ir de menos de 2 hasta 6 este último con mayor contenido de células somáticas

5.4. Contador fluorescente de células somáticas.

Antes de que las muestras fueran examinadas, estas se calentaron a 40 ° C en baño María y mantenidas a esa temperatura por 15 minutos. posteriormente fueron movidas cuidadosamente para después procesarlas automáticamente

Descripción del procedimiento

- a) Calentar y mover suavemente las muestras de leche que después son colocadas en el rack en el cual son transportadas automáticamente. donde las primeras son homogeneizadas y con una pipeta automática la cual toma 0.2 ml. al

mismo tiempo que la siguiente muestra de leche es homogeneizada. Las muestras son transferidas a un lente de 6 cristales en un carrusel, donde esta es diluida con 1.8 ml de tinción de trabajo y 2 ml de solución buffer. ejemplo a una dilución total de 1 en 20. La pipeta es limpiada al mismo tiempo. El colorante y la solución buffer han sido calentados, así la temperatura de la muestra es de alrededor de 60 °C.

b) En el siguiente paso la muestra diluida es mezclada vigorosamente por movimientos internos del carrusel. En esta etapa la siguiente muestra es homogeneizada por movimientos externos, posteriormente a esto, la muestra diluida es transportada a un acero transportador que gira alrededor del eje horizontal. En el punto más alto de la banda transportadora, la muestra de leche es irradiada por una luz azul de una lámpara de Xenón la cual produce fluorescencia en las células. Las imágenes fluorescentes de las células son enfocadas a través del microscopio por un resquicio en el escudo del *photomultiplier*. La salida de las pulsaciones son transmitidas a un contador digital y a un osciloscopio en el panel frontal del instrumento.

c) De cada muestra, el total de número de impulsos es impreso sobre una tira de papel al final del conteo. Al girar el acero transportador es limpiado y secado continuamente después de cada muestra.

d) La tira expuesta de la muestra tiene que ser de un espesor de 10 μm, con una anchura de 0.5 mm, y con una longitud efectiva de aproximadamente 3.5 m. el resultado es desplegado sobre un contador digital e impreso y representa el

número de células en 0.001 ml de leche, por lo tanto esto debe de ser multiplicado por 1000 para sacar el número de células por ml

Todo el sistema mecánico es operado por compresión de aire. Posteriormente a las últimas muestras de leche la maquina es limpiada en tres tiempos con liquido limpiador. La capacidad de la maquina es de 180 muestras por hora.

El colorante combinado con el ADN forma un complejo el cual al ser irradiado con la lámpara de Xenón emite una fuerte fluorescencia. Los glóbulos de grasa pueden también fluorescer pero a diferente longitud de onda la cual es absorbida por un filtro colocado en el *photo-multiplier* (Schmidt Madsen, 1975)

5.5. Análisis estadístico.

Se realizaron tres diferentes estudios

El primero consistió en determinar la correlación entre las lecturas obtenidas en la prueba de Wisconsin con las obtenidas en el Fossomatic, mediante el PROC CORR del paquete estadístico SAS (SAS Inst. Users Guide, 1998).

En un segundo estudio se utilizaron como efectos fijos la edad de la cabra (2, 3 - 4 y 5 - 6 años), periodo de lactancia (1 - 90, 91 - 180, 181 - 305, más de 305 días), tipo de parto (1, 2 y 3-4 crías) y se compararon con respecto al conteo de células somáticas obtenido mediante Fossomatic. Los datos de conteos celulares

fueron transformados a logaritmos para su normalización y se analizaron mediante el PROC GLM del paquete estadístico SAS (SAS Inst. Users Guide. 1998)

El tercer estudio es la producción de leche obtenida durante un periodo de 9 meses de las cabras en el experimento fue analizada utilizando el PROC GLM del paquete estadístico SAS (SAS Inst. Users Guide. 1998). Utilizando como covariables el tipo de parto y la edad de la cabra. Como efectos fijos se utilizaron el periodo de lactancia dividida en tres categorías (1 - 90, 91 - 180, más de 181 días) y la lectura de Wisconsin la cuál fue clasificada en cuatro categorías de acuerdo al número de quincenas consecutivas en que se registraron lecturas altas en la prueba de Wisconsin (4 5 a 6) en ambos medios a) Cero quincena, b) 1 a 2 quincenas con lecturas altas c) 3 a 4 quincenas y d) más de cuatro quincenas

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Primer estudio

Se observó una correlación significativa de 0.77 entre la lectura de Wisconsin y el conteo celular por Fossomatic ($P < 0.001$). La figura 1 muestra la relación existente entre estas dos pruebas

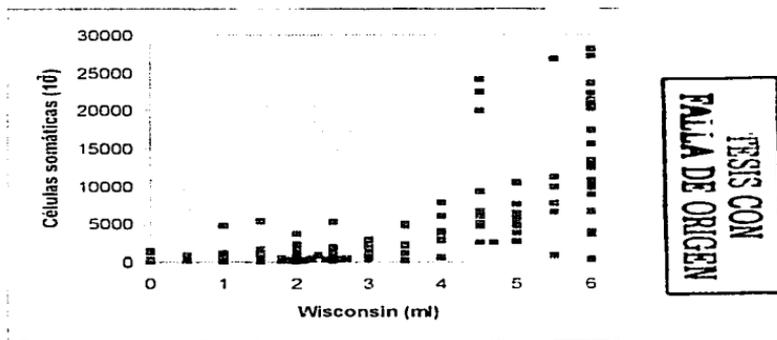


Figura 1. Relación entre los resultados de la prueba de Wisconsin con el Conteo Celular Somático

A partir de las categorías 4 hasta 6 de Wisconsin, se nota un incremento sustancial en el número de células somáticas, sin embargo también en estas

categorías se encontraron cabras con conteo celular no correspondiente a su nivel. En el presente estudio se encontraron lecturas tan altas como de 5000 hasta 15000×10^3

En este estudio la mayoría de los animales no mostraron signos clínicos de mastitis con excepción de una hembra (con lecturas de puntuación 6 en Wisconsin y conteo celular somático elevado) Las lecturas altas en Wisconsin y en conteo de células somáticas concuerdan parcialmente con el estudio de Wilson *et al.* (1995) quien menciona lecturas de células somáticas $1-2 \times 10^6$ en animales sanos y elevaciones en el conteo producidas por otros factores diferentes a la mastitis Aunque en el presente trabajo animales aparentemente sanos tuvieron lecturas mas altas

La correlación obtenida entre ambas pruebas en el presente estudio (Wisconsin y Fossomatic) Perrin *et al.* (1997) pudo deberse a la diferencia en precisión de las dos pruebas, notándose que Wisconsin fue menos precisa para la cuantificación de CS respuesta que pudo deberse a la cuantificación de otros componentes de la leche que influyeron en la lectura de Wisconsin y que no son estimados en Fossomatic como lo mencionan Paape y Capuco (1997)

Segundo estudio

El efecto del período de lactancia sobre el conteo de células somáticas fue significativo ($P < 0.001$), como se puede observar en la figura 2. Los menores conteos celulares se registraron en el período de 91-180 y los mayores durante el

periodo de más de 305 días de lactancia. Este resultado concuerda parcialmente con otros autores quienes refieren que a principios de la lactancia y al final los conteos celulares se incrementan (Rota *et al.*, 1993; Suriyasathaporn, *et al.*, 2000).

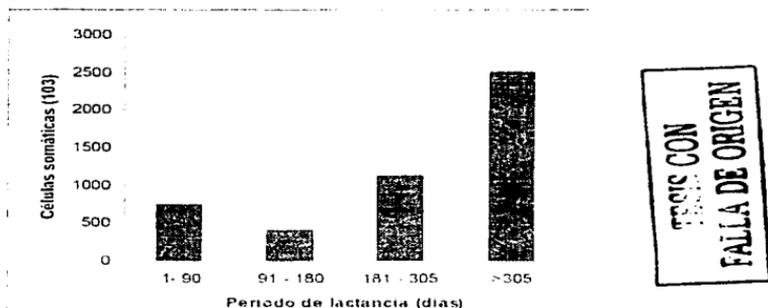


Figura 2 Efecto del periodo de lactancia sobre el conteo celular somático

El efecto del tipo de parto tuvo influencia estadística significativa sobre el conteo de células somáticas ($P < 0.001$), como se puede observar en la figura 3. Los mayores conteos celulares se observaron en hembras con una cría, en relación a las de 2 o más crías al parto. Es probable que esta respuesta se deba a la mayor obtención de leche y frecuencia de tomas que se da cuando las cabras tienen más de una cría, condición que permite a la ubre presentar menor contenido de células.

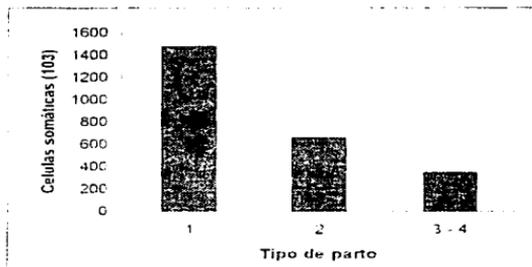


Figura 3. Efecto del tipo de parto sobre el conteo celular somático

El efecto de la edad de la cabra tuvo influencia estadística significativa sobre el conteo de células somáticas ($P < 0.001$), como se puede observar en la figura 4. Los mayores conteos celulares se observaron en hembras con edades superiores a los 4 años de edad.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

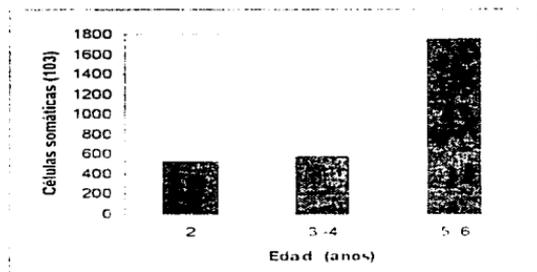


Figura 4. Efecto de la edad de la cabra sobre el conteo celular somático.

Tercer estudio.

Las covariables edad de la cabra y tipo de parto mostraron influencia significativa sobre la producción de leche ($P < 0.01$). Las betas obtenidas, fueron positivas y muestran que por cada unidad de aumento en la edad de la cabra la producción de leche se incrementó en 0.05 y que por cada unidad de aumento en el número de crías la producción de leche también fue incrementada en 0.093. Estas dos características y su importancia ya fueron discutidas en párrafos anteriores en relación a células somáticas y también incrementos en estas variables están asociadas con incrementos en la producción de leche como han sido mencionadas por algunos autores (Montaldo *et al.*, 1995).

LECHE CON
FALLA DE ORIGEN

Se encontró una interacción significativa entre las lecturas de Wisconsin con el período de lactancia ($P < 0.001$). La producción de leche fue mayor en las cabras que no mostraron en algún momento una lectura de 4.5 a 6 de Wisconsin, en comparación con cabras que si presentaron por lo menos una o más lecturas, esta relación con excepción del primer período de lactancia (1-90) se observó en todos los periodos (Figura 5)

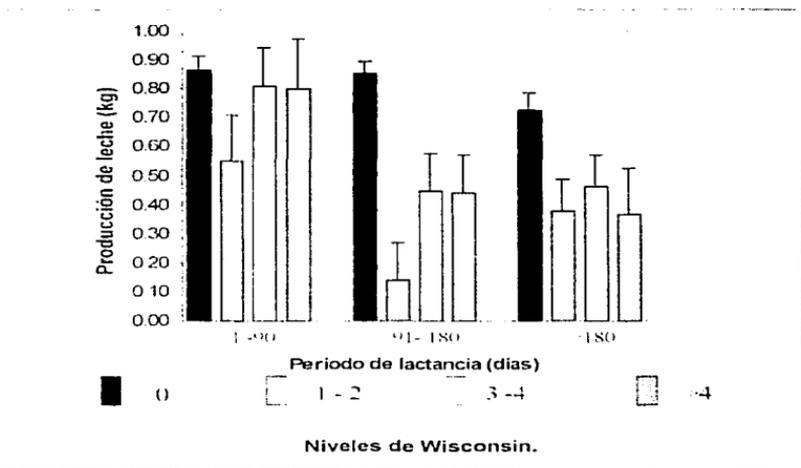


Figura 5. Efecto de la interacción del periodo de lactancia * lectura de Wisconsin sobre la producción de leche.

WISCONSIN
FALLA DE ORIGEN

7. CONCLUSIONES

El conteo de células somáticas en la leche si influyó en la producción de leche.

Se encontró una relación ligera entre la prueba de Wisconsin con el método de Fossomatic acorde con el nivel de precisión de cada uno de los métodos

La edad influyó en el conteo de CS y sobre la producción de leche

El tipo de parto influyó positivamente en la producción de leche e incrementos en el número de crías al parto se asociaron con menor número de células somáticas.

De igual forma a las otras variables el periodo de lactancia influyó, en la producción de leche y el conteo de CS

La prueba de Wisconsin en este estudio mostró ser un moderado indicador semicuantitativo de células somáticas y se requiere otro tipo de evaluación específica para DNA (microscopia directa y Fossomatic) para un diagnóstico más preciso

B. LITERATURA CITADA.

Arbiza S.I. y De Lucas T.J. 2001. La Leche Caprina y su Producción. Editores Mexicanos Unidos, S.A

Cassell, B. 1994. Using Somatic Cell Score Evaluations for Management Decisions. *J Dairy Sci* 77: 2130-2136.

Contreras, A Paape, M., and J. Miller, R.,H. 1999. Prevalence of Subclinical Intramammary Infection Caused by Staphylococcus epidermidis in a Commercial Dairy Goat Herd *Small Rumin Res* 31 203-208

Cuccuru, C Moroni, P., Zecconi, A., Casu, S., Caria, A., and Contini, A. 1997 Milk Differential Cell Counts in Relation to Total Counts in Sardinian Ewes *Small Rumin Res* 25 169-173.

Droke E. A., Paape, M. J. and Di Carlo, L. A. 1993. Prevalence of High Somatic Cell Counts in Bulk Tank Goat Milk. *J. Dairy Sci.* 76: 1035-1039.

Dulin, A. M., Paape, M. J., Schultz, W. D. And Weiland, B. T. 1983. Effect of Parity, Stage of Lactation and Intramammary Infection on Concentration of Somatic Cell and Cytoplasmic Particles in Goat Milk. *J. Dairy Sci.* 66 2426-2433.

Food Agriculture Organization (FAO) 2001. Apps FAO.org

Fox, L., Hancock D., Horner, S. 1992. Selective Intramammary Antibiotic Therapy During the Nonlactation Period in Goats *Small Rumin. Res.* 9: 313-318.

Galina, M., Morales, R., López, B., and Carmona, M. 1996. Effect of Somatic Cell Count on Lactation and Soft Cheese Yield by Dairy Goats *Small Rumin. Res.* 21: 251-257

Gonzalo, C., Carriedo, J., Baro, J., and San Primitivo, F. 1994. Factors Influencing Variation of Test Day Milk Yield, Somatic cell Count, Fat and Protein in Dairy Sheep *J Dairy Sci.* 77: 1537-1542.

Jonsson, P. and Wadstrom, T. 1993. Staphylococcus. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. Edit. Press Arnes. Pp. 21-33

L'éleveur de Chèvres. 1998. Top Lait. 5 Septembre

Lerondelle, C., Richard Y. and Issartial, J. 1992. Factors Affecting Somatic Cell Counts in Goat Milk. *Small Rumin. Res.* 8:129-139.

Montaldo, H., A. Juárez, J. M. Berruecos, and F. Sánchez. 1995. Performance of Local Goats and Their Buckcrosses with Several Breeds in México. *Small Rumin. Res.* 16: 97-105.

Paape, M. J., and Capuco, A. V. 1997. Cellular Defense Mechanisms in the Udder and Lactación of Goats. *J. Anim. Sci.* 75: 556-565

Park, Y. and Humprey R. 1986 Bacterial Cell Count in Goat Milk y Their Correlation with Somatic Cell Count, Percent Fat, and Protein. *J. Dairy Sci.* 69: 32-37

Perrin, G. G., Mallereau, M. P., Lenfant, D. and Baudry, C. 1997. Relationships Between California Mastitis Test (CMT) and Somatic Cell Counts in Dairy Goats. *Small Rumin. Res.* 26:167-170

Poutrel, B. and Lerondelle, C. 1983 Cell Count of Goat Milk California Mastitis Test. Coulter Counter and Fossomatic for Predicting Half Infection. *J. Dairy Sci.* 66: 2575-2579

Rota, A. M., Gonzalo, P. L., Rodríguez, A. I., Rojas, L., Martín, J. J. 1993. Somatic Cell Types in Goats Milk in Relation to Total Cell Count, Estage and Numer of Lactation. *Small Rumin. Res.* 12:89-98

SAS Inst. Users Guide. 1998.

Schmidt Madsen. 1975 Fluoro-opto-electronic Cell-counting on Milk. *Journal of Dairy Research.* 42:227-239.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
(SAGARPA) 1999 [Www SAGARPA gob mx](http://www.sagarpa.gob.mx)

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
(SAGARPA) 2002 [http //www.sagarpa.gob.mx/Dgg/prolec9601.htm](http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/prolec9601.htm)

Suruyasathaporn, W., Y.H. Schuklen, M.Nielen and A. Brand. 2000. Long Somatic Cell Count a Risk Factor for Subsequent Clinical Mastitis Dairy Her. *J. Dairy Sci.* 83: 1248-55.

Tizard, Y 2002 *Inmunología Veterinaria*. Edit Mc Graw Hill.

Wilson, D., J., Stewart, K., N. and Sears, P., M. 1995 Effect of Stage of Lactation Production, Parity y Season on Somatic Cell Counts in Infected and Uninfected dairy Goat's. *Small Rumin. Res* 16. 165-169.

Zeng S S 1996. Comparison of Goat Milk Standards with Cow Milk Standards on Analyses of Somatic Cell Count, Fat and Protein in Goat Milk. *Small Rumin Res* 21: 221-225

Zeng S S and Escobar, E. N. 1995. Effect of Parity y Milk Production on Somatic Cell Cuont, Standard Plate Count and Composition of Goat Milk. *Small Rumin Res.* 17: 269-274.

Zeng, S. S. and Escobar, E. N. 1996 Effect of Breed and Milking Method on Somatic Cell Count, Standard Plate Count and Composition of Goat Milk. *Small Rumin. Res.* 19: 169-175

Zeng, S. S., Escobar, E., N., and Popham, T. 1997. Daily Variations in Cell Count, Composition and Production of Alpine Goat Milk. *Small Rumin. Res.* 26: 253-260.

Zeng, S., S. Escobar, E., N. Hart S., P, Hinckley L, Baulthaus M, Robinson G., T, and Jahnke. 1999 Comparative Study of the Effects of Testing Laboratory, Counting Method, Storage and Shipment on Somatic Cell Counts in Goat Milk. *Small Rumin. Res.* 31: 103-107

Anexo1: Metodología para la técnica de microscopía directa

1 - Es apropiado preparar de manera estándar el test de las muestras para una calibración mecanizada y procedimientos automáticos de conteo de células.

2.- Referencia IDF-50B: 1965 leche y subproductos de leche - métodos de muestreo

3 - Definición: La propuesta del estándar internacional, es seguir aplicando esta definición.

celulas somáticas: Células con núcleo, ejemplo, todos los leucocitos y células epiteliales.

4 - Principio

Extender (0.001 ml) de leche para ser examinada sobre un portaobjetos (1 cm²).
Secando y tiñendo el frotis, y subsecuentemente contar las células teñidas usando un microscopio

Multiplicar el número de células contadas en un área definida por un factor de trabajo esto nos da el número de células por ml.

5 - Reactivos

Todos los reactivos tienen que ser de calidad analítica reconocida.

El agua usada tiene que ser agua destilada o agua desionizada o por lo menos agua purificada

5.1 - Colorante

Precaución el tetracloro etano es venenoso.

La preparación y aplicación del colorante tiene que ser llevado a cabo cerca de un extractor.

Composición: etanol al 95% (v/v) 50.0 ml

Tetracloro etano 40.0 ml

Azul de metileno 0.6 gr.

Acido acético glacial 5.0 ml

Nota: Como una alternativa, el tetracloro etano puede ser reemplazado por la misma cantidad de tricloro etano. en lugar de azul de metileno se puede usar bromuro de etilo.

Preparación: mezclar etanol y tetracloro etano en un vaso de precipitado en baño María (6:1) a 60-70 °C. Adicionar el azul de metileno y mezclar vigorosamente. enfriar en el refrigerador a 4 °C y luego adicionar el ácido acético glacial. Pasar la solución a través de un filtro de aproximadamente (6.3 micras) y almacenar en un frasco herméticamente cerrado. Es necesario filtrar de nuevo antes de usar.

6 - Equipo:

Equipo usual de laboratorio y en particular:

6.1 - Baño María capaz de mantener a 60-70 °C

6.2 - Baño María capaz de mantener a 30-40 °C.

6.3 - Filtro con un poro aproximado de 10-12 micras o menor.

6.4 - Microscopio, con resolución de 500 a 1000 X

6.5.- Microjeringa, con capacidad de 0.01 ml, con un máximo de tolerancia de 2%.

6.6 - Portaobjetos, con un área determinada de 20 mm por 5 mm.

6.7 - Plato caliente, capaz de mantener 50-70 °C

6.8 - Ventilador (secadora).

Nota: Si se usa bromuro de etilo se tiene que usar equipo de microscopia fluorescente.

7 - Muestras

7.1.- Ver IDF estándar.

7.2.- Cuando las muestras son usadas automáticamente, estas deben ser propiamente probadas.

7.3.- Las muestras tienen que ser almacenadas antes de prueba o preservadas. estas tienen que ser almacenadas a temperaturas de 2-4 °C.

7.4 - Las muestras que no son corridas 6 horas después del muestreo, tienen que ser preservadas adicionando ácido bórico. La concentración final del ácido bórico en la muestra no tiene que exceder 0.6gr / 100ml. Tales muestras pueden ser almacenadas no por largos periodos de 24 hrs 2-6 °C

8 - Preparación de la muestra para la prueba en el laboratorio calentar la muestra en baño María (6.2) a 30-40 °C. Mezclar vigorosamente y enfriar a la temperatura en la cual la microjeringa ha sido calibrada. por ejemplo 20°C.

9 - Procedimiento de cada muestra corrida mínimo dos frotis tienen que ser preparados y contados.

Limpia los portaobjetos (6.6), por ejemplo con etanol, secar con papel libre de polvo, flamear y enfriar

9.2.- Proporción de la prueba.

Tomar 0.01ml de la muestra para preparar la prueba (8) usando una microjeringa (6.5) Limpiar vigorosamente la jeringa fuera del contacto de la leche.

9.3 - Colocar la porción de la muestra en un portaobjetos limpio. primero en el contorno dibujado para darle forma (20mm X 5 mm). Para entonces llenar el área uniformemente Secar el frotis en la parrilla a un a temperatura moderada hasta que este completamente seco Mejores resultados se pueden obtener si el frotis es secado a temperatura ambiente por varias horas

9.4 - El siguiente paso es deslizar el frotis seco dentro del colorante por 30 min. Se requiere complementar el secado con ventilador Entonces sumergir el frotis en el agua hasta quitar el exceso de colorante otra vez secar y almacenar con protección contra el polvo

9.5.- Determinación.

Usando el microscopio contar las células nucleadas en el frotis (400 X) Estas son claramente reconocidas y la mitad de las más pequeñas tienen que ser visibles en el campo del microscopio. Evitar contar exclusivamente áreas de la periferia del frotis

Checar las más pequeñas una vez al mes de la propia preparación del frotis, así pues los resultados son seguros, contando diferentes partes del frotis.

10.- Expresión de Resultados.

10.1.- Método para calcular

10.1.1 - El número de células contadas es multiplicado por un factor de trabajo y nos da el número de células por ml. de leche.

10.2 - Calcular el factor de trabajo.

El largo de las líneas en que se debe contar es de 5 mm. El ancho de la línea corresponde al diámetro del campo del microscopio. Usar 0.01 ml. de leche, el factor de trabajo entonces es

$$\frac{20 \times 100}{d \times b}$$

d x b Donde:

d es el diámetro, en mm, del campo del microscopio.

b es el número de líneas contadas completamente.

11.- Precisión.

11.1 - Número mínimo de células que deben de ser contadas.

El conteo de células somáticas con microscopio puede ser también usado para calibración automática y procedimientos de conteo mecanizado. el coeficiente de variación del conteo sobre muestras idénticas debe no ser más alto que el del instrumento eléctrico. Sobre el coeficiente de variación de las muestras de leche contiene n de 400 000 a 600 000 cel/ml con aproximadamente 80 % neutrófilos no tiene que exceder el 5 %. Para encontrar estos requerimientos el número de células tiene que ser contado en cada muestra teniendo que ser menor a 400

La distribución de Poisson presupone que

$$M = V = s^2$$

Donde:

M = Valor medio.

V = Varianza

s = Desviación estándar

El coeficiente de variación es:

$$CV = \frac{s}{M} \times 100 \% \quad \text{o} \quad CV = \frac{s}{\sqrt{M}} \% \quad \text{o} \quad CV = \frac{100}{\sqrt{M}} \%$$

Donde:

M (media) Es el número de partículas (células) que han sido contadas.

12 - Reporte de la Prueba.

El reporte de la prueba tiene que mostrar el método usado, el microscopio es el factor de trabajo, y el resultado obtenido. También tienen que ser mencionadas algunas condiciones de operación que no son especificadas en el Estándar internacional o consideraciones opcionales, o bien algunas circunstancias que pueden tener influencia en los resultados.

El reporte tiene que incluir todos los detalles requeridos para la completa identificación de la muestra