



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**CORRELACIÓN ENTRE EL CONTEO DIRECTO DE CÉLULAS SOMÁTICAS Y LAS CUENTAS
BACTERIANAS TOTALES EN LECHE CAPRINA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN PRODUCCIÓN DE OVINOS
Y CAPRINOS**

PRESENTA:

M. en C. LÓPEZ DÍAZ ISMAEL

ASESOR: M. en C. ARTURO ÁNGEL TREJO GONZALEZ

Cuatitlan Izcalli, Estado de México, 2017



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.

ÍNDICE

I. Introducción.....	3
II. Revisión de Literatura.....	4
2.1 Anatomía y fisiología de la glándula mamaria.....	4
2.1.1 Anatomía microscópica de la glándula mamaria.....	4
2.2 Factores de defensa celulares y humorales de la leche.....	5
2.3 Las células somáticas.....	6
2.3.1 Función de las células somáticas.....	7
2.3.2 Recuento de células somáticas.....	8
2.3.3 Recuento de células somáticas a nivel de rebaño.....	9
2.4 Método verde de metilo-pironina (Pappenheim, 1899).....	10
2.5 Mastitis subclínica.....	12
2.6 Prueba de Wisconsin	13
2.7 Prueba de California.....	13
III. Objetivos.....	15
IV. Hipótesis.....	15
V. Materiales y Métodos.....	16
VI. Resultados.....	25
VII. Discusión.....	31
VIII. Conclusión.....	33
IX. Bibliografía.....	34

I. INTRODUCCIÓN.

Hablar de calidad de la leche significa, para el consumidor productos de buena calidad, de buena presentación, para el ganadero mayor producción al tener su rebaño sano y por lo tanto, mayores ingresos por venta de la leche. La Ley Federal de Salud (1994), en su artículo 240 establece que la leche para el consumo humano se entiende a la secreción natural de la glándula mamaria de cabras sanas y bien alimentadas y cuando proceda de otra especie animal se designará con el nombre de ésta. Se excluye el calostro obtenido cinco días posteriores al parto y quince días antes del mismo (Hernández y Bedolla, 2008).

Las células somáticas son células blancas propias del organismo que le sirven como defensa a la glándula mamaria de la cabras contra organismos patógenos. La importancia del conteo de células somáticas en la leche es que podemos conocer si la leche que obtenemos de la glándula mamaria es de buena calidad, así mismo, conoceremos el estado de salud de la misma al obtener un número elevado de células somáticas (Hernández y Bedolla, 2008).

El conteo de células somáticas (CCS) es el número de células por mililitro de leche, es por consiguiente un indicador útil para la concentración de leucocitos en leche. El CCS, es usado como un indicador de la salud de la glándula mamaria (Bradley y Green, 2005).

La determinación del contenido de células somáticas de la leche, del tanque, de la cabra o de los medios de la ubre es el medio auxiliar de diagnóstico más importante, para juzgar el estado de salud de la ubre de un rebaño. Con los resultados de las células somáticas se corrobora la calidad de la leche; también, es necesario obtener los resultados del tanque cuatro veces por mes (Wolter y Kloppert, 2004).

Se realizó el presente trabajo con el objetivo de estudiar la correlación que hay, entre el conteo directo de las células somáticas y las cuentas bacterianas totales en la leche de cabra, se llevo a cabo en los laboratorios de Microbiología y el de Histología y Biología, en el área de veterinaria, y el módulo caprino en el Centro de Enseñanza Agropecuaria en Campo 4, de la Facultad de Estudios Superiores Cuauhtitlan de la Universidad Nacional Autónoma de México.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Anatomía y fisiología de la glándula mamaria

Las glándulas mamarias son glándulas dérmicas modificadas, que se clasifican como glándulas exocrinas cuya función es secretar leche para la alimentación de los animales jóvenes, durante períodos diversos de vida post-natal; crecen durante la preñez y comienza a secretar leche después del parto (Báez, 2002; Bath, 1982).

El aparato suspensorio de la glándula está constituido por los siguientes 6 elementos:

- La piel, que colabora en la suspensión y estabilización de la glándula. Proporciona poco soporte a la ubre, pero protege el interior de la glándula contra fricciones y bacterias.
- La fascia superficial o tejido subcutáneo sujeta la piel a los tejidos anexos.
- El ligamento suspensorio lateral superficial, que está parcialmente constituido de tejido elástico, pero principalmente por tejido conjuntivo fibroso blanco.
- Ligamento suspensorio lateral profundo, son dos ligamentos que se originan del tendón subpélvico envolviendo a la ubre, se insertan en la superficie convexa de la misma y por medio de numerosas fibras emitidas penetran hacia el interior de la glándula, continuándose con la red intersticial propia de la glándula.
- El tendón sub-pélvico, prácticamente no forma parte de las estructuras de suspensión, pero es el que da origen a los ligamentos laterales superficiales y profundos.
- El ligamento suspensorio medio es la principal estructura de soporte de la ubre. La elasticidad del ligamento suspensorio medio es necesaria para permitir que la ubre aumente de tamaño al llenarse de leche (Schmidt, 1974).

2.1.1 Anatomía microscópica de la glándula mamaria

Los alvéolos son pequeñas estructuras como un saco, de forma esférica, tiene un lumen y están forrados de células epiteliales, estas células son las unidades básicas de secreción láctea de la glándula mamaria. Más de la mitad de la leche que se almacena en la glándula mamaria, se encuentra en el lumen de los alvéolos, el resto se almacena en los conductos que van de los lobulillos a los lóbulos (Fuquay, 1982).

Iniciación de la secreción de la leche

Para que inicie la lactación es necesario un equilibrio hormonal específico. Parece ser esencial para la lactación la presencia de una hormona llamada prolactina que se secreta por la glándula pituitaria (Gasque y Blanco, 2001). La prolactina es la hormona dominante en la iniciación de la lactancia, estimulada por el amamantamiento, así como otros estímulos además que debe interactuar con otras hormonas para conseguir su mayor efecto. Las hormonas que son sinergistas de la prolactina para estimular la lactancia, son: El cortisol, la hormona del crecimiento, la hormona tiroidea y la insulina (Fuquay, 1982). Hay otras hormonas esenciales para la producción de leche (hormona folículo estimulante y la progesterona). La ausencia de las hormonas de glándulas adrenales y de la tiroides y de las hormonas de la pituitaria, aparte de la prolactina, inhiben o detienen la lactación (Gasque y Blanco, 2001).

La calidad de la leche implica tres aspectos: La cantidad, sus componentes y los factores contaminantes (contaminación bacteriológica, conteo celular somático y presencia de residuos). La expresión concreta de la prevención de enfermedades y el bienestar animal es la producción de leche de calidad. Para lo cual debemos de hablar de salud de la ubre en lugar de mastitis, hablar de calidad de la leche en lugar de un enfoque meramente productivista y clínico, e incorporando al consumidor como una parte fundamental en el esquema de calidad (Saltijeral et al., 2003).

2.2 Factores de defensa celulares y humorales de la leche

La leche tiene un efecto que inhibe el crecimiento de bacterias, las mata o las hace inofensivas. Su efecto antibacterial se debe a factores de defensa celulares y humorales. En estos intervienen los leucocitos, que pueden ser neutrófilos (polimorfonucleares), los linfocitos y los macrófagos (principal tipo de células en la leche). Los factores humorales son las inmunoglobulinas, los factores del complemento, el sistema lactoperoxidasa-tiocianato-peróxidohidrógeno, la lactoferrina y la lisozima (Wolter et al., 2004). El paso rápido de los leucocitos sanguíneos a la luz alveolar es uno de los mecanismos naturales más importantes de defensa contra la mastitis. En el caso de una glándula mamaria sana se puede observar un contenido menor de 200 mil leucocitos por mililitro de leche (Trejo. 2015). El contenido de leucocitos aumenta como una respuesta a los microorganismos invasores. En el caso de la mastitis aguda, los conteos pueden llegar hasta millones de células somáticas por mililitro. Los leucocitos más numerosos durante el curso de una

mastitis son los polimorfonucleares (PMN). Éstos reconocen las bacterias marcadas con anticuerpos y los fagocitan. Pueden pasar de 12 a 24 horas después de la infección antes de que el contenido de PMN aumenta claramente (Wolter et al., 2004).

El reclutamiento local y la actividad de las células somáticas (o sea leucocitos) son los mecanismos de defensa inmune más importantes. Los linfocitos son las únicas células del sistema inmune que reconocen antígenos por medio de receptores de membrana y que son específicos para patógenos invasores. Existen dos tipos de linfocitos que difieren en función y productos proteicos, los linfocitos T y B. Los porcentajes de estas células pueden ser significativos dependiendo del estado de la lactancia y de su localización en los tejidos (Sordillo et al., 1997). Las células B, representan el 20% de los linfocitos. Su función es reconocer los antígenos o sustancias extrañas para producir anticuerpos específicos y secretar inmunoglobulinas localmente. Las células T se encargan de destruir a los antígenos por contacto directo, produciendo linfocinas (células asesinas y células auxiliaoras) que activan el complejo de histocompatibilidad (inmunidad humoral). El 45% de los linfocitos está conformado por este tipo de células (Westweber, 1993; Huirley y Morin). En distintas muestras de leches, los neutrófilos son la población de leucocitos más predominante en leche de glándulas mamarias infectadas (59% a 99% del total de células somáticas, dependiendo del estado de la lactancia) (Burton y Erskine, 2003).

2.3 Las células somáticas

Las células somáticas están constituidas por una asociación de leucocitos y células epiteliales. Los leucocitos se introducen en la leche en respuesta a la inflamación que puede aparecer debido a una enfermedad o, a veces, a una lesión. Las células epiteliales se desprenden del revestimiento del tejido de la ubre (Blowey y Edmondson, 1995). Se denomina a las células de la leche, a aquellas células propias del cuerpo (somáticas) en la leche. Estas provienen de la sangre y del tejido de la glándula mamaria. El contenido de células somáticas en la leche nos permite conocer datos claves sobre la función y el estado de salud de la glándula mamaria lactante y debido a su cercana relación con la composición de la leche un criterio muy importante de calidad de la leche (Wolter y Kloppert, 2004).

Una vez que las bacterias atacan las células del interior de la glándula mamaria la respuesta inmunitaria del organismo es enviar glóbulos blancos de la sangre para neutralizar a las bacterias invasoras.

Las bacterias que invaden el canal del pezón pueden clasificarse en contagiosas o ambientales. Las bacterias contagiosas se diseminan entre los pezones de una cabras o entre diferentes cabras de un rebaño como resultado de prácticas de manejo inadecuadas al momento de la ordeña (García, 2004). Las células somáticas son simplemente células del organismo (varios tipos de leucocitos o células blancas de la sangre) y normalmente están presentes en la leche en niveles bajos. La presencia de un incremento del número de estas células dentro del alveolo, es un indicador como respuesta a la infección.

Por tanto, las células somáticas son células corporales. Estas pasan a la leche procedente de la sangre y del tejido glandular. El contenido de células somáticas en la leche nos permite conocer el estado funcional y de salud de la glándula mamaria en periodo lactante; debido a su estrecha relación con la composición de la leche, es un criterio de calidad muy importante (Bedolla y Castañeda, 2007; Wolter et al., 2004). De todas las células de la leche de un medio infectado, aproximadamente el 99% serán leucocitos, mientras que el resto serán células secretoras que se originan de los tejidos de la glándula mamaria. Juntos, esos dos tipos de células constituyen la cuenta de células somáticas de la leche que comúnmente es expresada en mililitros (Philpot, 2001).

Las células somáticas en leche de cabra, se ven afectadas por la edad, periodo de lactancia, en el celo, por la alimentación entre otras causas y pueden aumentar hasta el doble sin tener un proceso infeccioso (De Los Reyes, 2011).

2.3.1 Función de las células somáticas

Cada leche contiene células somáticas, las cuales en una glándula sana sólo se presentan en un número pequeño. En este caso se trata de células de tejido (células epiteliales) y células inmunes, macrófagos y linfocitos. La importancia biológica de las células somáticas es que participan en la defensa contra infecciones de la ubre. Cuando hay estímulos o enfermedades de la glándula

mamaria aumenta en contenido de células somáticas, con lo cual el número de células inmunes aumenta considerablemente (Wolter y Kloppert, 2004).

2.3.2 Recuento de células somáticas

Efectuar conteos celulares somáticos es un procedimiento común, sobre todo en la industria láctea para medir la calidad de la leche, en el establo se utiliza como indicador de las infecciones de la glándula mamaria (Blowey y Edmondson, 1995).

Más del 98% de las células somáticas que se encuentran en la leche provienen de las células blancas que ingresan a la misma en respuesta a la invasión bacteriana de la ubre. Un alto conteo de células somáticas (CCS) se asocia con la pérdida de la producción de leche. Las glándulas mamarias que nunca se han infectado normalmente tienen CCS de 20,000 a 50,000 células/ml. (García, 2004).

Un conteo de células somáticas mayor de 200,000 células/ml indica la presencia de mastitis subclínicas. Los conteos de células somáticas por debajo de 400,000 células/ml son típicos de los rebaños que poseen buenas prácticas de manejo, pero que no hacen un particular énfasis en el control de la mastitis. Los rebaños que poseen un programa de control efectivo de la mastitis poseen en forma consistente conteos por debajo de las 100,000 células/ml. Conteos de células somáticas mayores de 500,000 células/ml indican que un tercio de las glándulas se encuentran infectadas y que la pérdida de leche debido a mastitis subclínica es mayor de 10% (García, 2004).

Las células somáticas son una parte importante en el mecanismo de defensa natural de la cabra. Cuando el tejido de la ubre se daña o se infecta, los números significantes de las células blancas de la sangre aumentan en la leche. La leche normal de cabra tiene un conteo celular más alto que la leche normal de las vacas. Esto ha sido por mucho tiempo una preocupación de dueños de cabras debido a las normas estándar y los problemas de mercado. El aumento de células somáticas en la leche de cabra es causado en parte por un aumento en la proporción de desprendimiento de estas células epiteliales (CEE) y la presencia de masas citoplasmáticas (CM) lo cual ocurre como consecuencia del proceso secretor apócrino (Hinckey, 1983).

Reducción de la producción de leche

Tras una infección intramamaria y la consiguiente inflamación existe, un incremento significativo del recuento de células somáticas, pero en el ganado caprino otros factores no infecciosos pueden tener un importante efecto sobre el recuento de células somáticas. El elevado recuento celular de la cabra es una característica que define de forma diferencial en esta especie. (Contreras A. Gómez M., *et, al*, 2008).

Cuando el recuento de células del rebaño aumenta, hay una disminución correspondiente en la producción de leche. Esta disminución se produce como consecuencia del daño infligido al tejido que produce la leche por las bacterias de la mastitis o de las toxinas que laboran.

Variaciones diarias y de temporada

En la ordeña de la tarde, los recuentos de células tienden a ser más elevados que en la ordeña de la mañana. Esto es debido en parte al intervalo más corto entre ambos ordeños y a la producción de menor cantidad de leche que se traduce en un efecto de concentración. En verano, los recuentos tienden a ser más elevados que en invierno aunque no se sabe con certeza la causa de esto (Blowey y Edmondson, 1995).

Cualquier acontecimiento que produzca estrés, como el estro, la enfermedad, entre otras, pueden influir en el recuento de células. Además de aumentar el número de leucocitos en la sangre, con frecuencia existe una disminución de la producción de leche que causa un efecto adicional de concentración (Saran y Chaffer, 2000).

2.3.3 Recuento de células somáticas a nivel de rebaño

El contenido de células somáticas en cabras, no debe superar el límite máximo entre un rango de 1,500,000-2,000,000 contenido de células somáticas por cm^3 (Palma, 2015).

El nivel de células somáticas como medida normal es de 200,000 células/ml de leche de una muestra del tanque del establo (cuadro uno), arriba de este número se considera como anormal y es indicativo de que existe una infección en el rebaño productor (Hernández, 2003).

Un rebaño con un recuento de menos de 200,000 tendrá poca mastitis contagiosa en comparación con un rebaño con un recuento de más de 500,000 que tendrá un problema grave, probablemente significan que el 50% del ganado en producción está enfermo de mastitis subclínica, elevando considerablemente las pérdidas económicas. No obstante, los recuentos de células no se relacionan necesariamente con el número de casos clínicos, ya que el problema podría ser debido a un nivel elevado de mastitis ambiental que repercutirá en el recuento de células (Cabrera, 1962; García, 2003).
 Conteo de células somáticas: Indica tanto el nivel de mastitis existente en el rebaño, como la calidad de la leche producida.

Grado Prueba de California	Rango de Células Somáticas	Interpretación
N (Negativo)	0 – 200,000	Medio Sano
T (Trazas)	200,000 – 400,000	Mastitis Subclínica
1	400,000 – 1,200,000	Mastitis Subclínica
2	1,200,000 – 5,000,000	Infección Seria
3	Más de 5,000,000	Infección Seria

Cuadro 1. Rango de células somáticas

2.4 Método verde de metilo-pironina (Pappenheim, 1899)

Identificación de DNA y RNA

El fundamento de este método se basa en la identificación de ácidos nucleicos tanto del DNA como RNA a partir del reconocimiento de grupos de fosfatos. Esta técnica utiliza dos colorantes catiónicos (+) aplicados simultáneamente bajo condiciones cuidadosamente controladas, de concentración y pH, es un rango de 4.0-4.6 siendo 4.0 el medio óptimo para la mayoría de los materiales. Se basa fundamentalmente en la forma y tamaño de las moléculas del colorante que determinan cual será el color impartido a cada uno de los ácidos nucleicos (Ciernan, 1999).

La amplia configuración en hélice del catión del Verde de Metilo le otorga un mayor carácter catiónico, por lo que, es atraído electrostáticamente a los grupos fosfatos en el lado extremo de

la cadena de DNA y es mantenido en esta posición por ayuda de las uniones no iónicas a las pentosas del DNA y las nucleoproteínas asociadas, demostrando que posee una mayor afinidad por moléculas más polimerizadas favoreciendo por una alta estéreo-especificidad por parte de la molécula de colorante hacia las moléculas de la cadena de DNA., ver Figura 1 (Kiernan, 1999).

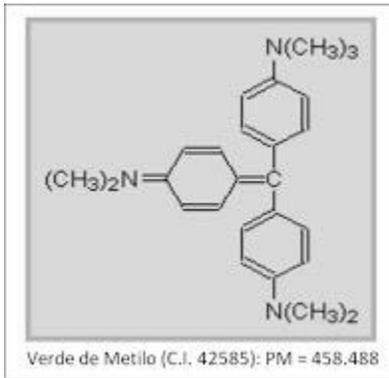


Figura 1 tomado de (Kiernan, 1999)

La Pironina Y, posee un leve carácter catiónico, una alta afinidad a zonas menos polimerizadas y una estructura planar que se intercala entre los pares de bases de los ácidos nucleicos y no logra entrar al DNA porque sus iones son excluidos por el Verde de Metilo en el lado externo de la cadena, por lo que, se une al RNA que al ser una estructura más abierta, admite fácilmente los cationes de la Pironina Y los cuales se intercalan firmemente entre los pares de bases, neutralizan los fosfatos y excluyen al Verde de Metilo que no se puede intercalar, ver Figura 2 (Kiernan, 1999).

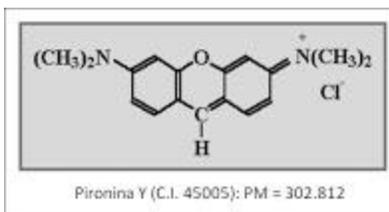


Figura 2 tomado de (Kiernan, 1999)

Los resultados son una tinción de cromatina (DNA) azul verdoso, nucleolo (RNA) rojo brillante y RNA citoplasmático rojo. En el método de verde de Metilo Pironina Y, donde se utilizan dos colorantes catiónicos otros materiales basofílicos que los ácidos nucleicos pueden ser teñidos principalmente por la Pironina y u otros cromógenos planares catiónicos, por lo que, es necesario realizar un tratamiento de extracción, químico o enzimático, a las muestras de tejido para verificar

la especificidad de la tinción, especialmente en el caso del RNA. Su mecanismo se caracteriza mas por la selectividad de los colorantes hacia DNA (verde de Metilo) y RNA (pironina Y) que por su especificidad hacia los ácidos nucleicos (Kiernan, 1999).

El Verde de Metilo suele estar contaminado con trazas de Violeta de Metilo, por lo que, al prepararlo tiene que ser purificado decantándose en una solución acuosa de cloroformo, ya que el Violeta de Metilo es soluble en él, hasta que formen dos fases y eliminar la fase inferior, que posee el cloroformo con el Violeta de Metilo disuelto en el hasta que se observe transparente (Kiernan, 1999).

2.5 Mastitis subclínica

La mastitis constituye el mayor problema en ganado lechero y causa de grandes pérdidas económicas a los ganaderos. La mastitis subclínica se caracteriza por la presencia de un microorganismo en combinación con un conteo elevado de células somáticas en leche, esta puede desarrollar fácilmente una inflamación y no tener tratamiento (Satu 2009; Gallegos y Moncada, 2011). También constituye un reto para los técnicos, ya que la identificación es una empresa difícil que requiere del uso de métodos prácticos y sensitivos.

Esta enfermedad es causada por diferentes agentes microbianos, tanto por la magnitud como por la frecuencia con que se presentan, las prácticas deben ser encaminadas hacia el control de la transmisión de los diferentes patógenos causantes de mastitis. Este tipo de mastitis no presenta cambios visibles en la leche o ubre. Apenas se percibe una reducción en el rendimiento de la leche, siendo alterada su composición por la presencia de componentes inflamatorios y bacterias (Gallegos y Moncada, 2011).

Esta presentación de la enfermedad es la más persistente en el ganado lechero; Ocurre frecuentemente, y puede conducir a grandes pérdidas económicas no solo por la reducción de la producción, también por los elevados conteos de células somáticas presentes en los tanques de leche (Ariznabarreta et al., 2002). En la práctica, los casos de mastitis subclinica con frecuencia no son detectados rápidamente, o pueden incluso no ser reconocidas por el ordeñador (Wellenberg et al., 2002). Para identificar estos casos de mastitis se hace necesario las técnicas de laboratorio como la medición del conteo de células somáticas y el cultivo bacteriológico (Sixtos, 2011).

Existen varios métodos para el diagnóstico de la mastitis subclínica, que varían en sensibilidad, eficiencia, y costo. Como por ejemplo la prueba de Wisconsin o la prueba de California.

2.6 Prueba de Wisconsin

La prueba de Wisconsin, fue diseñada para el uso en el laboratorio y es utilizada para estimar el contenido de células somáticas de muestras de leche fresca mezclada o leche de tanques de enfriamiento (Hernández y Bedolla 2008).

El procedimiento es el siguiente:

Colocar 3 ml de leche en los tubos especiales WMT, agregar 3ml del reactivo por debajo de la superficie de la leche y tapar los tubos, mover la gradilla 10 veces casi hasta posición horizontal en 10 segundos.

Después mezclar dejar reposar los tubos durante 15 segundos, como reactivo puede usarse el mismo que se utiliza para la prueba de California diluido 1:1 con agua destilada.

Invertir la gradilla y en posición vertical dejar fluir la mezcla durante 15 segundos exactamente la mezcla sobrante e interpretar los resultados.

Conteos celulares de 100 x 1000 células/ml se consideran valores normales, valores de 500 a 1000 sospechosas y más de un millón de células se considera mastitis subclínica (INIFAP-SAGAR, 2005).

2.7 Prueba de California

La prueba de California, ha sido empleada durante décadas y sigue siendo la prueba mas utilizada a nivel de campo para el diagnóstico de mastitis. (Hernández y Bedolla 2008).

Consiste de la siguiente manera:

Se toma una muestra de leche de cada medio en una raqueta para pruebas de California (PCM) limpia. La raqueta tiene cuatro pequeños compartimientos marcados como A, B, C, y D para identificar los medios de los que proviene cada muestra. La solución PCM debe ser reconstituida de acuerdo a las instrucciones del producto.

Paso 1: Tome aproximadamente una cucharadita (2cc) de leche de cada medio.

Paso 2: Agregue igual cantidad de solución PCM a cada compartimiento.

Paso 3: Rote la raqueta con movimientos circulares hasta mezclar totalmente el contenido. No lo mezcle por más de 10 segundos.

Paso 4: “Lea” rápidamente la prueba. La reacción visible desaparece en unos 20 segundos. La reacción recibe un calificación visual, entre más gel se forme, mayor es la calificación.

Lectura del PCM:

N = Negativo (No Infectado). No hay espesamiento de la mezcla.

T= Trazas (Posible Infección). Ligero espesamiento de la mezcla. La reacción “Trazas” parece desvanecerse con la rotación continua de la raqueta.

1= Positivo Débil (Infectado). Definido espesamiento de la mezcla, pero sin tendencia a formar gel. Si la raqueta se rota por más de 20 segundos, el espesamiento puede desaparecer.

2= Positivo Evidente (Infectado). Inmediato espesamiento de la mezcla con ligera formación de gel. Mientras la mezcla se agita, esta se mueve hacia el centro de la copa, exponiendo el fondo del borde externo. Cuando el movimiento se detiene, la mezcla se nivela y cubre todo el fondo de la copa.

3= Positivo Fuerte (Infectado). Hay formación de gel y la superficie de la mezcla se eleva (como un huevo frito). Esta elevación central permanece aún después de detener el movimiento de rotación de la raqueta de PCM.

Interpretación de los grados del PCM El grado de PCM está directamente relacionado con el promedio del conteo de células somáticas.

Una reacción de T (trazas) o más indica que hay mastitis subclínica en el medio (Mellenberger y Roth, 2004).

III. OBJETIVOS

Objetivo general

Establecer un protocolo para evaluar la relación que existe entre el conteo directo de las células somáticas y la cantidad de bacterias presentes en el despunte de leche de cabra.

Objetivos particulares

Comparar la relación que existe entre el conteo directo de células somáticas y la cantidad de bacterias presentes.

Identificar los puntos críticos para la evaluación con el método de tinción de verde metil pironina.

IV. HIPÓTESIS.

El conteo directo de células somáticas puede ser un método efectivo para evaluar la cantidad de bacterias en la leche caprina.

V. MATERIALES Y MÉTODOS.

El siguiente trabajo se realizó en las instalaciones de la FES-Cuauhtitlan, UNAM, en los laboratorios de Microbiología y el de Histología y Biología. Las tomas de leche fueron recolectadas en el módulo de caprinos.

Las cabras de las que se obtuvo la muestra de leche fueron las siguientes, de acuerdo al número de identificación Cuadro dos:

1	04	34	15v268
32	69	77	24n268
36	77	82	55v268
49	79	170	79v268
104	82	178	96na268
149	149	180	154n268
170	170	933	Mez268
178	Gringa		155a268
912			64ez268
933			6636268

Cuadro 2. Número de identificación de las cabras

Se obtuvieron 37 muestras del despunte que equivale a la primera leche de cada ordeña.

La leche se recolectó en tubos estériles de 40 ml y en el laboratorio de Histología y Biología (Foto uno), se separó en dos alícuotas. Una fracción se destinó para realizar la tinción de verde metil-pironina (Foto dos y tres).

En un tubo eppendorf de 500 μ L, se agregaron 500 μ L de la muestra de la leche, se homogenizó (brotes). Se extrajeron 10 μ L con micropipeta, para hacer las extensiones, se secaron las muestras al aire, se fijaron por 5 minutos con metanol. Se hidrataron con agua destilada por 5 minutos, se tiñeron con verde metil-pironina sigma aldrich HT70116-500ml.

Sol. Modificado de Karnousky por Macdowell y Trump 1976:

5.0% 1% paraformoldehido

7.5% 1.5% glutaraldehido

1g 0.002% cloruro de calcio

500 l tamopen fosfato a 0.12 m pH 7.2-7.4

5g 1g 2g 10g

0.75ml 1.5 3 al 15 al

100mg 200 400 ag 2.0g

50ml 100 200 l 1000

Alcohol absoluto acético.

5% pironha 17.5ml

2% verde metil pironina 10ml

Agua destilada 250ml

Solución buffer

M/5 acetato buffer pH 4.8

Microscópio óptico american optica modelo spencer 0(McManus y Mowry, 1964).



Foto 1 Preparación de las muestras.

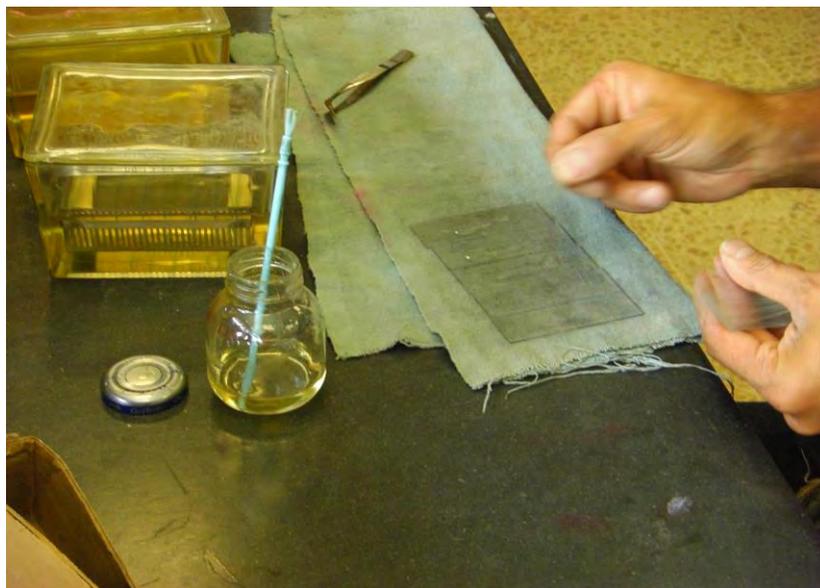


Foto 2 Preparación de tinción de verde metil-pironina.



Foto 3 Preparando las muestras.

Para el conteo directo en el microscopio utilizando la tinción de Verde metil pironina se realizó el siguiente procedimiento: se colocaron 10 μL de leche en un área aproximada de 2 cm^2 de un portaobjetos, una vez seca la muestra de leche se agregó el colorante y se contaron las células, se utilizó un microscopio óptico utilizando el objetivo 100X el conteo de células se multiplico por 10,000 para calcular el número de células en un centímetro cuadrado y así obtener el total de células por mililitro (Fotos cuatro y cinco).

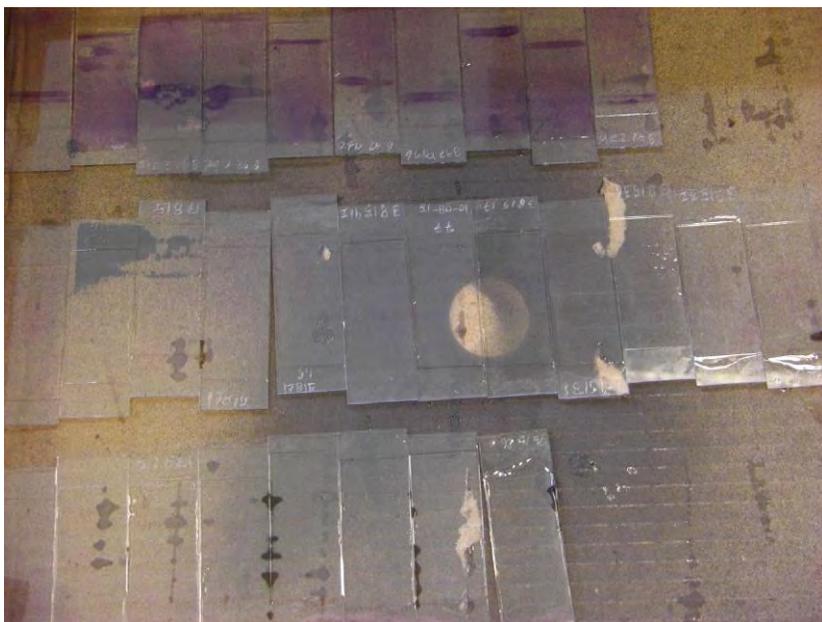


Foto 4 Remojando las muestras.



Foto 5 Fijación de las muestras.

La segunda fracción se destinó al cultivo bacteriológico en el laboratorio de Microbiología que consistió en un conteo de colonias totales por muestra de leche.

Se utilizó:

- Cajas de petri de 2pulg.
- Agar estandar
- Tubos con tapa
- Micropipetas y puntas
- Mecheros
- Alcohol
- Agitador
- Incubadora
- Microscopio electrónico



Foto 6 Incubando las muestras.

Para las cuentas bacterianas en cultivo, se utilizaron cajas de Petri de 2 pulg., con agar estándar, se agregó un 0.5 mL de leche y se incubaron a 37° C durante 48 horas, después de esto se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias para bacterias mesófilas (Fotos de la siete a la 11).

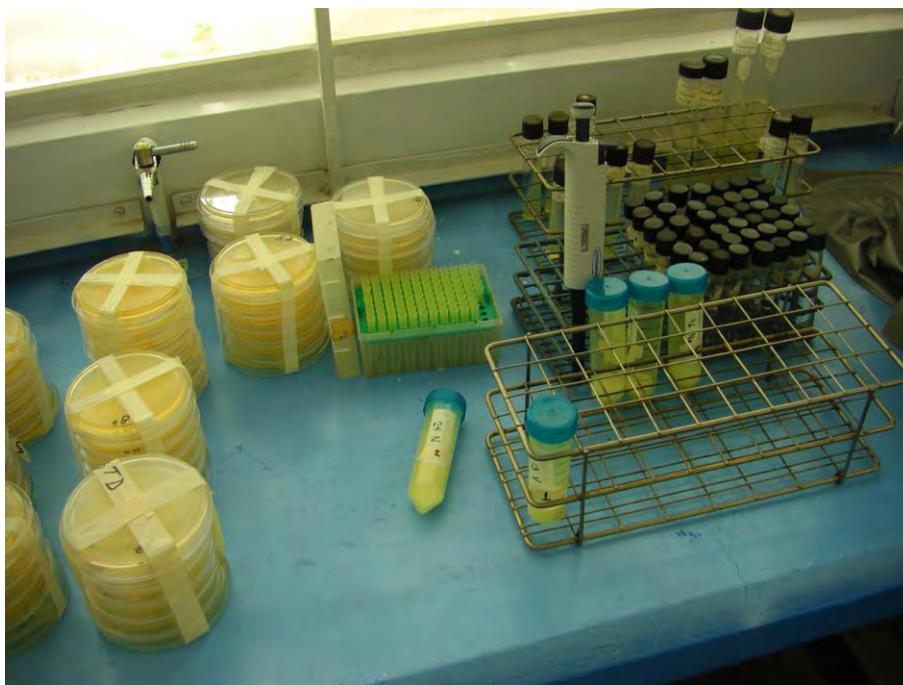


Foto 7 Preparación del cultivo bacteriológico.



Foto 8 insemnando las cajas.



Foto 9 incubación de las muestras.

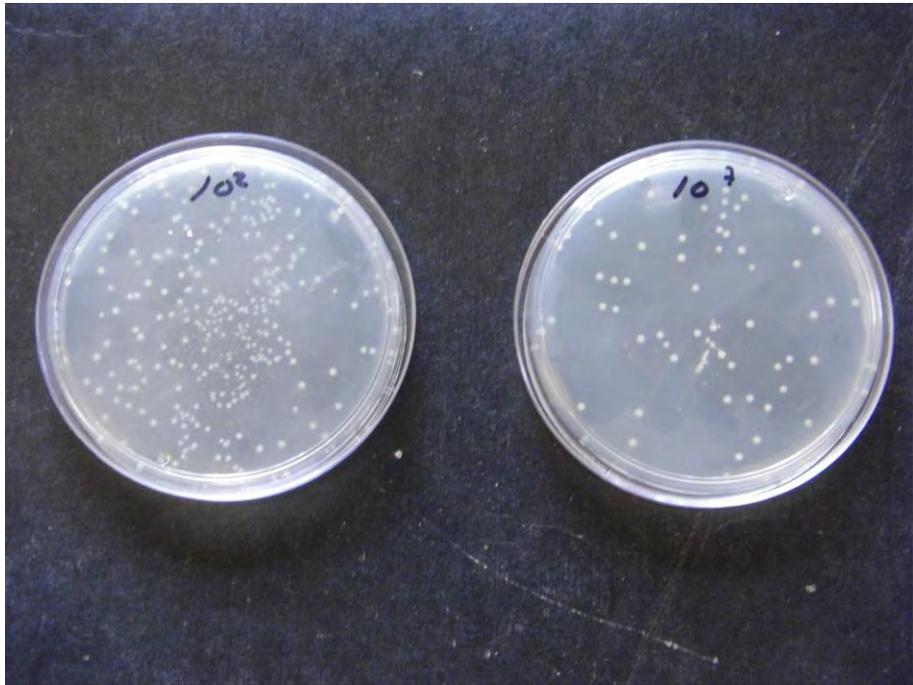


Foto 10 colonias de bacterias.

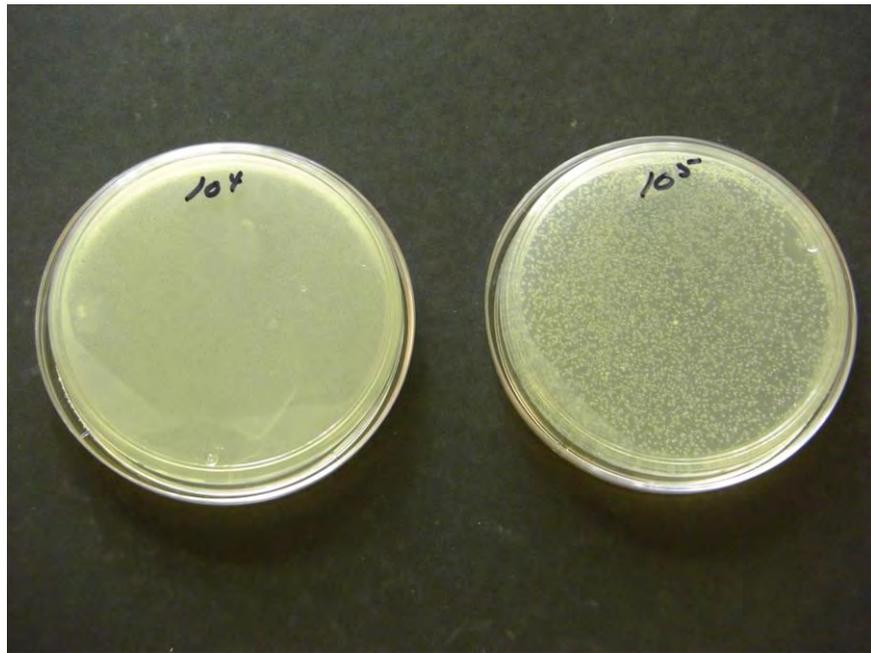


Foto 11 Conteo de bacterias.

Y para el análisis estadístico se utilizó la prueba de correlación lineal utilizando el programa pspp. El término correlación significa relación mutua, el análisis de correlación mide e indica el grado en el que los valores de una variable se relacionan con los valores de otra.

VI. RESULTADOS.

Se presentan estos resultados en cuadro separado, cada cuadro representa las muestras recolectadas por día.

Se obtuvieron los siguientes resultados: en el conteo de unidades formadoras de colonias para bacterias mesófilas, en el Cuadro tres.

Las muestras de las cabras que no presentaron crecimiento bacteriano fueron la No. uno y la No 912, mientras que las muestras de las cabras No 170 tuvo 3×10^7 , la No 178 tuvo 20×10^9 y la No 933 tuvo 13×10^7 fueron las que mas tuvieron presencia de patógenos bacterianos y la cabra No 32 tuvo 5×10^2 (fue la mas baja).

No de muestra	Identificación de la cabra	Mesófilos UFC/ML
1	1	Sin crecimiento
2	32	5×10^2
3	36	34×10^3
4	49	1×10^5
5	104	2×10^4
6	149	31×10^3
7	170	3×10^7
8	178	20×10^9
9	912	Sin crecimiento
10	933	13×10^7

Cuadro 3 Resultados de presencia de mesófilos, en leche de cabra.

En el Cuadro cuatro la muestra que no presentó patógenos bacterianos fue la cabra la gringa, mientras las que tuvieron los valores más altos fueron la cabra No 82 tuvo 5×10^7 , la cabra No 149 tuvo 2×10^7 y la cabra No 170 tuvo 2×10^6 , y las mas baja fue la cabra No 04 tuvo 1×10^2 .

No de muestra	Identificación de la cabra	Mesófilos UFC/ML
1	04	1×10^2
2	69	8×10^3
3	77	7×10^3
4	79	5×10^3
5	82	5×10^7
6	149	2×10^7
7	170	2×10^6
8	Gringa	Sin crecimiento

Cuadro 4 Resultados de presencia de mesófilos, en leche de cabra.

En el Cuadro cinco la muestra que presentó crecimiento más alto fue la cabra No 82 tuvo 15×10^8 , y la más baja fue la cabra No 933 tuvo 9×10^3 .

No de muestra	Identificación de la cabra	Mesófilos UFC/ML
1	34	20×10^5
2	77	22×10^6
3	82	15×10^8
4	170	11×10^6
5	178	1×10^6
6	180	1×10^5
7	933	9×10^3

Cuadro 5 Resultados de presencia de mesófilos, en leche de cabra.

Y en el Cuadro seis, las que no presentaron presencia de patógenos bacterianos fueron la cabra No 15v268, la cabra No 55v268, la cabra No 96na268 y la cabra No 64ez268, mientras que la más alta fue la cabra No 6636268 tuvo 46×10^7 y la menor fue la cabra No 24n268 tuvo 1×10^2

No de la muestra	Identificación de la cabra	Mesófilos UFC/ML
1	15v268	Sin crecimiento
2	24n268	1x10 ²
3	55v268	No detectados
4	79v268	1x10 ³
5	96na268	No detectados
6	154n268	1x10 ⁴
7	Mez268	1x10 ⁴
8	155a268	1x10 ³
9	64ez268	No detectados
10	6636268	46x10 ⁷

Cuadro 6 Resultados de presencia de mesófilos, en leche de cabra.

En el Cuadro número siete se presenta la cantidad de células somáticas de las muestras de la leche de cabra, la que no presento ninguna célula fue la cabra No 170, mientras la que obtuvo la más alta fue la cabra No 933 tuvo 1400 y las que presentaron menores fueron la cabra No 104, la cabra No 178 y la cabra No 912 con 100 cada una.

No de muestra	Identificación de la cabra	No de células somáticas
1	1	700
2	32	500
3	36	300
4	49	600
5	104	100
6	149	500
7	170	0
8	178	100
9	912	100
10	933	1400

Cuadro 7 resultados del número de células somáticas en leche de cabra

En el Cuadro ocho solo la muestra de la cabra No 69 tuvo 500 células somáticas y todas las demás no se detectaron ninguna

No de la muestra	Identificación de la cabra	No de células somáticas
1	04	0
2	69	0
3	77	500
4	79	0
5	82	0
6	149	0
7	170	0
8	Gringa	0

Cuadro 8 resultados del número de células somáticas en leche de cabra

En el Cuadro nueve las muestras que no hubo presencia de células somáticas fueron la cabra No 82 y la cabra No 178, mientras la que presentó mayor número de células somáticas fueron la cabra No 34 tuvo 1100 y la cabra No 180 tuvo 1000, mientras la que obtuvo menos fue la cabra No 77 tuvo 200.

No de muestra	Identificación de la cabra	No de células somáticas
1	34	1100
2	77	200
3	82	0
4	170	100
5	178	0
6	180	1000
7	933	500

Cuadro 9 resultados del número de células somáticas en leche de cabra

En el Cuadro 10 la muestra que no presentó células somáticas fue la cabra No mez268, la que presentó mas fue la cabra No 96na268 tuvo 5000 y las mas baja fue la cabra No 15v268 tuvo 100.

No de muestra	Identificación de la cabra	No de células somáticas
1	15v268	100
2	24n268	1000
3	55v268	800
4	79v268	3500
5	96na268	5000
6	154n268	1500
7	Mez268	0
8	155a268	900
9	64ez268	300
10	6636268	200

Cuadro 10 resultados del número de células somáticas en leche de cabra

En el Cuadro 11 se presentaron las correlaciones entre el conteo de colonias bacterianas y el número de células somáticas y se observaron que la correlación fue negativa $r = -0.094$, por lo que no es significativa esta correlación y en contra de lo esperado, cuando las células somáticas aumentaron, las colonias bacterianas disminuyeron.

MODELO	r	R ²	R2 CORREGIDA	ERROR
1	- 0.094	0.009	-0.022	1032.35

No existieron diferencias significativas.

Cuadro 11 correlación entre células somáticas y colonias de bacterias mesófilas en leche de cabra.

En el Cuadro 12, se anotaron los valores estadísticos descriptivos encontrados en este trabajo.

	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DESVIACIÓN STD
COLONIAS	35	0	2 ¹⁰	634523906.3	3379831154.0
CÉLULAS	34	0	5000.0	591.18	1021.10

Cuadro 12 valores estadísticos descriptivos para células somáticas y cuentas totales de bacterias.

VII. DISCUSIÓN

En ausencia de infección, la leche de cabra presenta, respecto a la de oveja y vaca, tres características peculiares relacionadas con los elementos celulares que contiene: elevado porcentaje de polimorfonucleares (PMN), elevado contenido de partículas citoplasmáticas y un mayor recuento de células somáticas (Mohammed, 2009).

La primera especificidad en la secreción láctea caprina es que los polimorfonucleares (PMN) suponen el principal componente celular tanto en glándulas sanas como en infectadas (Dulin et al., 1983; Rota et al., 1993a; Sierra et al., 1999) representando aproximadamente el 70% de las células somáticas.

Una segunda especificidad de la leche de cabra es que presenta un elevado número de partículas citoplasmáticas, lo cual es debido a que la secreción láctea de la cabra es de tipo apocrino (Dulin et al., 1982; Dulin et al., 1983; Paape y Capuco, 1997).

Finalmente, un tercer aspecto característico de la leche de cabra es que su concentración celular es más elevada que en la leche de vaca y oveja (Corrales et al., 1997) . Así, en ausencia de mastitis, el RCS en la leche de cabra pueden variar entre 270.000 y 2 millones de cels/ml, mientras que en la leche de vaca y oveja se situaría entre 10.000 y 200.000 cels/ml (Paape et al., 2007). Además, los estudios histopatológicos realizados en ubres de ganado caprino con altos recuento de células somáticas (RCS), no han encontrado ningún tipo de trastorno en la glándula, lo cual sugiere que los altos RCS son de naturaleza fisiológica y no patológica (Zeng y Escobar, 1997).

De acuerdo a los resultados que se obtuvieron en este trabajo, analizando las muestras tenemos lo siguiente:

Del Cuadro No tres y el No siete la muestra de leche de la cabra No uno, no presentó crecimiento bacteriano y tuvo la cantidad de 700 de células somáticas, la muestra de leche de la cabra No 912 no tuvo crecimiento bacteriano y tuvo la cantidad de 100 de células somáticas. La cabra No 170 tuvo 3×10^7 de patógenos bacterianos y tuvo cero de células somáticas. La cabra No 933 tuvo 13×10^7 de patógenos bacterianos y tuvo 1400 de células somáticas.

Del Cuadro No cuatro y el No ocho tenemos que, la cabra No 77 tuvo 7×10^3 de colonias bacterianas y de células somáticas 500, mientras que las demás muestras no se detectaron la presencia de células somáticas.

Del Cuadro No cinco y el No nueve, la muestra No 82 tuvo 15×10^8 de colonias bacterianas (la más alta) y cero crecimiento de células somáticas, la muestra No 178 tuvo 1×10^6 de crecimiento bacteriano y no se detecto presencia de células somáticas. La muestra No 34 tuvo 20×10^5 de colonias bacterianas y de células somáticas tuvo 1,100 (la más alta).

Del Cuadro No seis y el No 10, la muestra No 24n268 tuvo cero crecimiento de patógenos y de células somáticas tuvo 100, la muestra No 55v268 tuvo cero presencia de colonias bacterianas y tuvo 800 de células somáticas. La muestra No 96na268 tuvo cero de colonias bacterianas y de células somáticas tuvo 5,000 (la más alta), la muestra No 64ez268 tuvo cero presencia de colonias bacterianas y de células somáticas tuvo 300, mientras que la muestra No mez268 tuvo 1×10^4 de colonias bacterianas y de células somáticas tuvo cero.

VIII. CONCLUSIÓN

Por lo tanto es sabido, que las cabras tienen de manera natural más células somáticas en la leche que otros animales domésticos que producen leche como la oveja y la vaca, esto ha dificultado determinar con alguna precisión los límites de la mastitis subclínica, en el presente trabajo la correlación fue negativa es decir que mientras que las células somáticas aumentaban las colonias bacterianas bajaron. Esto permite inferir que las células somáticas que son leucocitos de defensa actuaron con eficiencia.

La hipótesis propuesta en la cual las células somáticas permiten detectar la cantidad de bacterias en la leche, no pudo ser probada debido a que las correlaciones no fueron estadísticamente significativas, fueron negativas por lo que no se puede establecer una relación directa entre leucocitos y cargas bacterianas.

En base a lo anterior se puede establecer una nueva hipótesis en la cual las cabras tienen una tendencia natural a padecer menos mastitis que otros rumiantes domésticos.

IX. Bibliografía

- Ariznabarreta, A., Gonzalo, C., San Primitivo, F. 2002. Microbiological Quality and Somatic Cell Count of Ewe Milk with Special Reference to Staphylococci. *J. Dairy Sci.* 85.
- Báez, G. J. J. 2002. Estudio epidemiológico de mastitis subclínica bovina en el sector II de Téjaro,
- Bath, D. L. 1982. Anatomía y fisiología de la glándula mamaria. 2ª ed. Editorial Interamericana. México.
- Bedolla, C. C., Castañeda, V. H. y Wolter, W. 2007. Métodos de detección de la mastitis bovina. *REDVET. Rev. Electrón. Vet.* Vol. VIII, No 9, Septiembre.
- Blowey, R. y Edmondson, P. 1995. Control de la mastitis en granjas de vacuno de leche. *Acribia.* Zaragoza.
- Bradley, A. y Green, M. 2005. Use and interpretation of somatic cell count data in dairy cows. *In practice.* 27.
- Burton, J. L. y R. J. Erskine. 2003. Immunity and mastitis. Some new ideas for an old disease. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 19 (1).
- Cabrera, V. 1962. Apuntes dictados en la material propedéutica médica. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, México.
- Contreras A. Gómez Marín A. Amores J. De La Fe C. Corrales J.C. Sánchez A., 2008 Mastitis y células somáticas en cabras lecheras, Departamento de sanidad animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Murcia España.

- Corrales, J.C.; Contreras, A.; Sánchez, A.; Marco, J.; Rabal, F. (1997). Adaptación de las condiciones de la aplicación de la directiva comunitaria 92/46 para el recuento de células somáticas, a nivel de tanque, en leche de ganado caprino. XXI Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Logroño.
- De Los Reyes Hernández A. L., 2011, Evaluación de células somáticas en leche de cabra en producción extensiva de la Comarca Lagunera, Tesis de MVZ, Torreón Coahuila, México.
- Dulin, A.; Paape, M.; Schultze, W.; Weinland, B. (1983). Effect of parity, stage of lactation, and intramammary infection on concentration of somatic cells and cytoplasmic particles in goat milk. *Journal of Dairy Science*. 66.
- Dulin, A.; Paape, M.; Wergin, W. (1982). Differentiation and enumeration of somatic cells in goat milk. *Journal of Food Protection*.
- Fuquay, J. W. 1982. Reproducción animal aplicada. Ed. Manual Moderno. México.
- Gallegos, A., Moncada, J., N. 2011. Uso De Extractos De Semillas De Cítricos Para El Control De La Mastitis Bovina
- García, A. D. 2004. Células somáticas y alto recuento bacteriano. ¿Cómo controlarlo?. *J. Dairy Sci*.
- García, S. R. 2003. Células somáticas una advertencia sin darnos cuenta. *Holstein de México*. 34 (8).
- Gasque, G.R., y Blanco, O.M.A. 2001. Zootecnia en bovinos productores de leche. Departamento de producción animal: rumiantes. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. México.

- Hernández Reyes, J.M. y Bedolla Cedeño, J. L. C. 2008, Importancia del conteo de células somáticas en la calidad de la leche, revista electrónica de veterinaria 1695-7504, vol. IX, número 9.
- Hernández, V. M. A. 2003. Tips en vacas lecheras, como contribuir a la utilidad neta de la empresa lechera. Holstein de México. 34 (2).
- Hinckley, L.S.: 1983. "Somatic cell count in relation to caprine mastitis," AgriPractice, August.
- Huirle, W, L. y Morín. sf. Mastitis Lesson A 308. www.classes.uiuc.edu/AnScib308/.
- INIFAP-SAGAR, 2005, CENID-Microbiología, QFB Laura Hernández Andrade, Colonia Palo Alto, México D. F. CP. 05110
- ISO/IDF (2008) Milk -Enumeration of somatic cells. Part 1:Microscopic method (reference method). ISO 13366-1 .IDF 148-1 (ISO and IDF).
- Kiernan J.A. 1999 Histological and Histochemical Métodos, Theory and Practice, Third Edition.
- McMachus M.D and Mowry Robert 1964, Stainig Methods Histologic and Histochemical, Ed. A. Hoeber International, Tokio Japón.
- Mellenberger R. y Roth J. C. 2004, Prueba de mastitis california, Departamento de Ciencia Animal, Universidad del Estado de Michigan y Departamento de Ciencia Lechera, Universidad de Wisconsin-Mádison, Traducido por Rivera Humberto, Universidad de Wisconsin-Madison.
- Mohammed Mehdid El Amine, 2009, Efecto del celo y del estrés sobre el recuento de células somáticas en la leche de cabra Tesis doctoral, Universidad Politècnica de València Departamento de ciència animal, Valencia España.

- Paape, M. J.; Capuco, A.V. (1997) Cellular defence mechanisms in the udder and lactation of goats. *Journal of Animal Science*. 75.
- Paape, M.J.; Wiggans, G.R.; Bannerman , D.D.; Thomas, D.L.; Sanders A.H., Contreras, A., Moroni, P.; Miler, R.H. (2007). Monitoring goat and sheep milk somatic cell counts. *Small Ruminant Research* 68.
- Palma Parodi, C, 2015, Calidad de leche y queso de cabra, evaluación de rendimiento quesero, Tesis de Licenciatura en Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ciencias Veterinarias –UNCPBA, Buenos Aires Argentina.
- Philpot, W. N. 2001. Importancia de la cuenta de células somáticas y los factores que la afectan. III Congreso Nacional de Control de Mastitis y Calidad de la Leche. León Guanajuato. México.
- Prin-Mathieu, C. 2002. Enzymatic Activities of Bovine Peripheral Blood Leukocytes and Milk Polymorphonuclear Neutrophils during Intramammary Inflammation Caused by Lipopolysaccharide. *Clin Diagn Lab Immunol*. 9(4).
- Rota, A.M.; Gonzalo, C.; Rodriguez, P. L.; Rojas, A. I.; Martín, L.; Tovar, J. J. (1993a). Somatic cell types in goats milk in relation to total cell count, stage and number of lactation. *Small Ruminant Research* 12.
- Saltijeral, O. J. A., Córdova, I. A., y Sánchez, L. N. 2003. Importancia de la calidad de leche desde la vaca hasta la mesa. V Congreso Nacional de Control de Mastitis. Aguascalientes, Aguascalientes. México.
- Saran, A., y Chaffer, M. 2000. Mastitis y calidad de la leche. Ed. Inter-Médica. Buenos Aires.
- Satu Pyörälä, Suvi Taponen, 2009 Coagulase-negative staphylococci-Emerging mastitis pathogens.

- Schmidt, G. H. 1974. Biología de la lactación, anatomía de la glándula mamaria. Ed. Acribia. Zaragoza.
- Sierra, D.; Sánchez, A.; Corrales, J.C.; Contreras, A. (1999). Differential cell counts in goat's milk. En: Milking and milk production of dairy sheep and goats. (Ed: Barillet, F. and Zervas, N. P.). Wageningen Pers. (EAAP, 95).
- Sixtos, E., S. 2011. Frecuencia y etiología de la mastitis bovina en Cherán.
- Sordillo, L. M., K. Shafer-Weaver y De Rosa, D. 1997. Immunobiology of the mammary gland. J Dairy Sci; 80(8).
- Trejo Ortiz Ulises A. 2015, Diagnóstico, tratamiento y prevención de la mastitis clínica y subclínica, Taller de buenas prácticas de ordeño para el aseguramiento de la calidad de la leche, Jalapa Veracruz, octubre.
- Wellenberg, G.J., van der Poel, W. H. M. and Van Oirschot, J. T. 2002. Viral infections and bovine mastitis: a review. Veterinary Microbiology, Article 2361.
- Westweber, J. G. 1993. Staphylococcus aureus. Mastitis: part 1 virulence, defense mechanisms establishment of infection. Fisiopatología de la ubre. UNAM, México.
- Wolter, W., Castañeda H., Kloppert, B y Zschöck, M. 2004. Mastitis bovina. Prevención, diagnóstico y tratamiento. Editorial Universitaria. Universidad de Guadalajara. México.
- Wolter, W., y Kloppert, B. 2004. Interpretación de los resultados del conteo celular y de la aplicación de la terapia. Avances en el Diagnóstico y Control de la Mastitis Bovina. Guadalajara, Jalisco, México.
- Zeng, S.S.; Escobar E.N; Popham, T. (1997). Daily variations in somatic cell count, composition, and production of Alpine goat milk. Small Ruminant Research 26.