

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN**

Análisis del grado de asociación entre el número de células somáticas en leche de tanque frío y la seroprevalencia de brucelosis, en hatos lecheros del complejo agropecuario de Tizayuca, Hidalgo.

**SERVICIO SOCIAL**

Que para obtener el título de:

**MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

**P R E S E N T A :**

**NAVARRETE SÁNCHEZ BRENDA OLANDA**

Asesor: MVZ. Rafael Pérez González

Coasesores: MVZ. Jose Antonio Vazquez García  
Dr. Fernando Osnaya Gallardo  
MVZ. Javier Hernández Balderas



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

2006.

## AGRADECIMIENTOS

Amis padres, por darme la oportunidad de vivir, protegerme, quererme, darme una hermana y una carrera.

Ami padre, "Chuchin"; por ser ejemplo de responsabilidad y entrega al trabajo, por darme siempre su apoyo y trabajar todo este tiempo para solventar mis estudios. Y por que me ha enseñado a seguir siempre hacia delante y ser mejor ayer.

A mi madre, "Yolita"; por que siempre ha estado junto a mí cuando más la he necesitado. Gracias por impulsarme a terminar una carrera y ser mejor cada día, tanto en mi profesión como en mi vida diaria.

A mi hermana, "Callita"; por toda la felicidad que me ha dado su compañía durante toda mí vida, y todo el apoyo que me ha dado en esta última etapa.

A mi marido, "Guñi"; que nunca me dejó sentir sóla durante la carrera, siempre estuvo conmigo, como amigo, como novio y ahora como padre de mi hija. Y que ha tenido que trabajar duro para que yo pueda terminar con éxito la etapa final de mis estudios.

A mi hija, Ximena; que me dio la fuerza para terminar mi servicio social, y me da las ganas que necesito para ser un buen médico y sobresalir en mi carrera.

A mis amigos Nadia, Nancy, Alma, Edgar, Victor, Carlos, Fabiola, Akin, Ofelia, Alberto, Iván, Jazmín, que han grabado en mi memoria tantos recuerdos y son como mi segunda familia.

A los doctores Antonio y Mario, de la cueca lechera de Tizayuca, que me apoyaron muchísimo durante la realización de mi trabajo, así como a las laboratoristas: Irene y Maria Cruz, que de igual manera siempre me ayudaron en la realización de mi trabajo y al doctor Rafael Soto, a todos ellos que aparte de ayuda me brindaron su amistad. Y

A los doctores Rafael Pérez y Fernando Osnaya, que me asesoraron en todas las dudas que tuve durante la carrera y en la realización de este trabajo.

Y principalmente a Dios, que me regalo la vida y que me ha mantenido en este mundo con salud, para realizar todos los logros que he tenido.

## INDICE

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	5
LECHE	5
CONTEO DE CÉLULAS SOMÁTICAS	7
Usos del CCS	7
Células somáticas	6
Métodos para el CCS	
1) Métodos de campo	9
2) Métodos electrónicos	10
3) Método óptico	10
Factores que influyen en el CCS	11
BRUCELOSIS	13
Historia	13
Agente etiológico	14
Patogenia	14
Prevención	16
1) Vacunación	16
2) Manejo de reemplazos	17
3) Manejo de crianza	17
4) Muestreo serológico	18
OBJETIVOS	21
CUADRO METODOLOGICO	22
DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES	27
RESULTADOS	28
EVALUACIÓN Y ANÁLISIS	28
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIONES	34
BIBLIOGRAFÍA	35

## RESUMEN

El presente trabajo se realizó durante la estancia por servicio social en el Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca (CAIT); ubicado en el municipio de Tizayuca estado de Hidalgo. Tiene como objetivo el determinar el grado de asociación que existe entre el conteo de células somáticas en tanque frío y la seroprevalencia de brucelosis bovina, en los hatos que fueron sometidos a este estudio.

En dicho complejo existe un total de 126 establos, de los cuales sólo participó el 65%, debido a la renuencia de algunos ganaderos.

Para poder llegar al objetivo de este trabajo se utilizaron muestras de leche de tanque frío de cada uno de los establos a las que se les practicó la prueba de microscopía directa basada en la prueba de la FDA (Food and Drug Administration), para realizar el conteo de células somáticas (CCS).

Simultáneamente al muestreo de leche de tanque frío, el personal del departamento de salud animal de Complejo, tomó muestras de sangre del total de cabezas de los hatos en estudio. De estas muestras se obtuvo el suero sanguíneo para la realización de la prueba de tarjeta (Rosa de bengala), para determinar el porcentaje de prevalencia de brucelosis en cada hato. Para evitar incluir establos falsos positivos, a todos los sueros que resultaron positivos se les realizó la prueba de Rivanol.

Una vez que se obtuvo el porcentaje de brucelosis existente cada hato y el CCS en cada uno de ellos, se procedió a hacer un análisis de correlación por medio del programa Excel obteniendo como resultado una correlación de 30% entre ambos eventos.

Con una correlación significativa entre ambos eventos, se procedió a determinar la ecuación de estimación, que nos permite predecir la relación entre el porcentaje de la seroprevalencia de brucelosis y el aumento en el conteo de células somáticas; por medio de la ecuación de regresión:  $Y = a + b X$ .

Para sustituir la fórmula de regresión, fue necesario trabajar con el método de los mínimos cuadrados para obtener el valor de  $a= 5.6138$  y  $b= 0.007$ . El valor de X se sustituye por cada uno de los valores del porcentaje de brucelosis.

Aunque la ecuación de estimación no es un predictor perfecto, la regresión si nos da una idea clara del conteo de células somáticas que esperamos obtener según el grado de seroprevalencia de brucelosis en los hatos. Para demostrar que la estimación es confiable se procedió a comparar los resultados obtenidos de la ecuación de estimación y los datos reales obtenidos en el muestreo de cada establo. Al hacer la comparación antes mencionada, se encontró con que los datos reales obtenidos no son exactamente los estimados, pero entran dentro del rango permitido al calcular el error estándar de la estimación.

Considerando los resultados obtenidos se puede concluir que aunque la presencia de brucelosis no es la única causa del aumento en el CCS, si se encontró una influencia directa entre el aumento de seroprevalencia de brucelosis y el aumento en la cuenta de células somáticas.

## INTRODUCCIÓN

La leche es el alimento más apreciado por el ser humano, debido a que ésta es su primer alimento ingerido; aunque a lo largo de nuestra vida los requerimientos van disminuyendo no así su importancia en la alimentación.

Dentro de su composición química, los contenidos más significativos los encontramos en las proteínas, la grasa y la lactosa; todos estos modificables con agregados comerciales que corresponden a las necesidades y gustos de los consumidores en las diversas etapas y regiones en las que se consume <sup>(14)</sup>.

Aunque es difícil saber con exactitud cuando se comenzó a utilizar la leche de rumiante en la alimentación humana, hay evidencias de que entre 6000 y 8000 años a.C. en Asia y el noroeste de África domesticaban al ganado vacuno y empleaban su leche <sup>(38)</sup>.

En sus inicios, los productos derivados de la leche, como la mantequilla, se usaban como bálsamo y no fue sino hasta el siglo XIII, cuando la grasa butírica se utilizó como alimento <sup>(38)</sup>.

En América, los españoles introdujeron el ganado bovino durante la conquista en el siglo XVI desde entonces hasta el siglo XIX, la ganadería se desarrolla fundamentalmente en las haciendas <sup>(14)</sup>.

El bovino fue empleado y explotado como fuente de trabajo, transporte, vestimenta, medicina, deporte, combustible, abono y símbolo religioso. Su otra función como fuente de carne y productos lecheros para el consumo humano representaba más bien un subproducto útil, estrictamente temporario, que se obtenía generalmente, después de haber satisfecho todas las demás necesidades <sup>(21)</sup>.

Aunque los bovinos son más eficientes sobre otros animales ganaderos, para transformar los alimentos que se reciben en artículos comestibles y nutritivos para los seres humanos,

además de que utilizan con mayor facilidad los alimentos disponibles (forrajes y subproductos de alimentos) que se pueden consumir directamente de los humanos <sup>(4)</sup>, no fue si no hasta principios del siglo XX cuando se observa un incremento en la demanda de la leche, se puede decir que la consolidación de la lechería comercial se da a partir de los años 40, condicionada por el desarrollo industrial y el mercado interno <sup>(14)</sup>

La ganadería es una de las actividades de mayor importancia económica y social relacionada con el sector pecuario en el país, sin embargo dadas las condiciones económicas que imperan en la industria lechera, es una de las actividades que se encuentran más afectadas, por lo cual se obliga al productor a ser más eficiente para seguir siendo competitivo en el mercado <sup>(36)</sup>.

En los últimos años el PIB ganadero ha crecido a una tasa menor que la de la población humana.

La producción de leche de bovino nacional alcanzó para el 2001 un volumen de 9,472 millones de litros, teniendo una tasa de crecimiento medio anual de 1997 al 2001 de 4.8% <sup>(19)</sup>. Para el 2002 la producción fue de 9,658,282 millones de litros teniendo un crecimiento anual de 2% y el pronóstico para el 2003 fue de 9,871,441 millones de litros con un crecimiento de 2.2% <sup>(14)</sup>.

Con respecto a la producción mundial de leche aunque ha sido creciendo a lo largo 10 años de análisis, este no ha sido un incremento significativo. En 1990 la producción mundial fue de 542 millones de litros y para el año 2000 aumentó a 578 millones de litros, de estos los principales países productores fueron: India con 82 millones de litros, E.E.U.U. con 76 millones de litros, Rusia 32 millones de litros, Alemania 28 millones de litros, Pakistán 26 millones de litros y Francia 25.6 millones de litros. Por su parte México se encontró en el decimonoveno lugar con 6.4 millones de litros en 1990 y en el 2000 ocupó el decimotavo lugar con 9.44 millones de litros <sup>(43)</sup>

La producción lechera va aumentando en proporción cada vez menor, que el ritmo de crecimiento de la población humana, las principales causas de una deficiente producción de leche entre otras son, la falta de seguridad en la tenencia de las tierras, lo cual inhibe el interés de la inversión privada, además de que hay un inadecuado desarrollo de las

diversas prácticas de manejo, el control de la venta de la leche, es paralelo a la libertad de los precios en los insumos necesarios en la producción (concentrados, forrajes, pie de cría, equipo, instalaciones, servicios médicos, entre otros), llega a ser un problema porque los egresos superan a los ingresos, con lo cual muchos productores se ven obligados a vender sus animales y cerrar el negocio.

Sin embargo no es fácil permitir un libre aumento en el precio de la leche, ya que esta constituye un alimento indispensable y se debe procurar que se mantenga a un precio accesible a cualquier nivel económico <sup>(2)</sup>.

Para producir más cantidad, mejor calidad y mayor ingreso en la industria láctea es necesario tener conocimiento de los aspectos que influyen en la producción de leche tales como nutrición, reproducción, genética, sanidad y zootecnia <sup>(3)</sup>.

Con esto, se puede evaluar el funcionamiento de una explotación lechera a fin de determinar los problemas que afectan directa o indirectamente la producción con la finalidad de implementar medidas para resolverlos y prevenirlos <sup>(5)</sup>.

La sanidad es una de las áreas a las que se les debe poner mayor atención, ya que si un establo tiene problemas, inmediatamente repercute en la cantidad y calidad de la leche producida y esta a su vez tanto en el precio, como en la comercialización de ésta.

#### CONTEO DE CÉLULAS SOMÁTICAS

Existen variados análisis para determinar la calidad de la leche, sin embargo uno de los más frecuentes es el conteo de células somáticas, el cual permite tener un criterio sobre el estado funcional y de salud de la glándula mamaria en estado lactante y debido a su estrecha relación con la composición de la leche se considera un elemento de calidad muy importante <sup>(45)</sup>

El recuento de células somáticas es el número de células existentes en la leche y se utiliza como indicador de la infección de la ubre. En la actualidad, casi todos los países tienen algún sistema de sanción económica que es impuesta si el recuento de células o el TBC (recuento total de bacterias) de la leche supera un determinado umbral <sup>(7)</sup>.

El conteo de células somáticas tiene muchos otros usos, algunos de los más importantes se listan a continuación:

- Determinación de la prevalencia de mastitis subclínica en el hato, especialmente aquellas causadas por microorganismos contagiosos.
- Evaluación de la severidad y duración de las infecciones en vacas individuales.
- Saber si la situación de mastitis en el hato está mejorando o empeorando.
- Determinar si la mastitis es principalmente contagiosa, ambiental o de ambas.
- Evaluar el manejo antes y después del parto.
- Identificar las vacas problemas.

El conteo de células somáticas puede emplearse en las plantas procesadoras de leche para obtener información acerca de:

- a) La calidad de la leche cruda
- b) Condiciones higiénicas con las cuales fue producida la leche en el establo.
- c) Vida potencial de anaquel de la leche pasteurizada y productos lácteos procesados hechos con la leche en cuestión <sup>(33)</sup>.

Como células somáticas se designa a las células del propio organismo que se encuentran en la leche, las cuales proceden de la sangre y del tejido glandular <sup>(43)</sup>. En otras palabras, 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<sup>(7)</sup>

Cuando las bacterias penetran en el canal del pezón se multiplican y dan comienzo a la inflamación como parte de la respuesta inmune de la glándula mamaria, con la llegada de leucocitos a la glándula <sup>(39)</sup>.

La leche contiene células somáticas que en una glándula mamaria sana sólo se presentan en cantidades pequeñas. La importancia biológica de las células somáticas estriba en la intervención en la defensa contra infecciones de la ubre<sup>(45)</sup>. El porcentaje de los diferentes tipos de células somáticas en la leche de las glándulas saludables es 1) Macrófagos: 60%, 2) Linfocitos: 25%, y 3) Neutrófilos o leucocitos polimorfonucleares 15% <sup>(33)</sup>.

En definitiva, son los neutrófilos los responsables de conteos celulares altos en la leche de animales con cuartos infectados <sup>(39)</sup>, puesto que aproximadamente el 99% de todas las células de la leche son leucocitos, mientras que el restante 1% serán células secretoras que se originan de los tejidos mamarios <sup>(33)</sup>.

Para poder interpretar los resultados obtenidos en el recuento de células somáticas, es importante saber cuantas células debe de contener una leche por mililitro a fin de poderla considerar normal o sana. Según estudios hasta el año 1969, debía considerarse la cifra de 200,000 a 300,000 células por mililitro como límite del estado normal mientras que valores que alcanzaban las 500,000 células por mililitro debían tomarse como más que sospechosas <sup>(17)</sup>.

Actualmente, el incremento en el comercio internacional de productos lácteos ha promovido que muchos países desarrollen estándares rígidos para la cuenta de células somáticas. La unión europea ha impuesto un límite de 400,000/ml, mientras que Canadá usa un nivel de 500,000/ ml, y los Estados Unidos de 750,000/ml <sup>(33)</sup>.

Las concentraciones de células somáticas pueden variar de miles a millones por mililitro, dependiendo del organismo específico involucrado y del grado de inflamación <sup>(33)</sup>.

El recuento de células somáticas en la leche se puede realizar

- 1) A nivel de campo o “al pie de la vaca”.
- 2) Métodos electrónicos
- 3) Método óptico o directo <sup>(39)</sup>.

#### **Métodos de campo:**

En el establo lechero hay dos métodos útiles para poder observar si un cuarto de la ubre tiene un número elevado de células <sup>(45)</sup>: la prueba de la mastitis de California o CMT y la prueba de conductividad eléctrica.

#### **Prueba CMT**

Es una prueba muy sencilla para descubrir la mastitis subclínica, porque valora groseramente el recuento de células en la leche, esta no proporciona un resultado

numérico, sino más bien una indicación de si el recuento es elevado o bajo <sup>(7)</sup>. La prueba consiste en el agregado de un detergente a la leche, el alquilsulfonato de sodio, causando la liberación del ADN de las células presentes y éste se convierte en combinación con agentes proteicos de la leche en una gelatina. A mayor presencia de células mayor formación de gelatina, además la prueba posee un colorante que indica cambios de pH ocurridos en la leche a raíz de la inflamación <sup>(39)</sup>.

#### Prueba de conductividad eléctrica

Se puede determinar al inicio de la ordeña, con un aparato manual especial. Este método se basa en que con un aumento en el contenido de células en la leche, la conductividad aumenta <sup>(45)</sup>. La presencia de bacterias aumenta el sodio y el cloro en la leche, mientras que disminuyen los iones de calcio y la lactosa, además de aumentar el cloro y el sodio por la salida de sangre durante la inflamación <sup>(31)</sup>. Sin embargo este método a dado como resultado un gran número de falsos positivos y negativos por lo que no es muy confiable y actualmente tiene una aplicación muy limitada en todos los hatos <sup>(34,45)</sup>.

#### **Métodos electrónicos:**

La industria lechera puede utilizar uno de los 2 métodos de determinación automática de los recuentos de células: El contador fossomatic o el contador Coulter <sup>(7)</sup>.

El fossomatic, basa su cálculo en la tinción fluorométrica del material nuclear, mientras que el Counter Coulter, cuenta partículas de un diámetro determinado, que para el caso serían las células, pero en el rango de recuento entrarían otras partículas <sup>(39)</sup>.

Aunque ambos métodos tienen correlaciones igual de altas con la técnica de microscopía directa, el fossomatic tiene resultados más satisfactorios <sup>(28)</sup>.

#### **El método óptico:**

Es también llamado recuento microscópico directo de células somáticas, y aunque ha sido sustituido por las pruebas electrónicas, al ser de poca utilidad cuando se trata de un gran número de muestras, ésta técnica mantiene su utilidad para los trabajos de investigación <sup>(7,39)</sup>.

Si bien existen algunas variantes para la realización de esta técnica, el principio básico es el desarrollado por Prescott y Breed, utilizado por primera vez con ésta finalidad, en el cual se extiende una cantidad determinada de leche sobre un portaobjetos calibrado, se tiñe y se cuenta el número de células mediante observación microscópica. <sup>(7,17,23)</sup>. Actualmente se realiza la prueba microscópica directa de la FDA (Anexo 1).

### **Factores que influyen el conteo de células somáticas.**

El recuento de células somáticas es una determinación muy grosera y existe una diversidad de factores que pueden influir en el resultado como: Mastitis, edad de la vaca, fase de lactación, estación del año, un ordeño al día, tamaño del hato, localización geográfica, congelación y descongelación de muestras, momento del día, nivel de producción láctea, tetas pisoteadas o ubres lesionadas y presencia de algunas otras enfermedades <sup>(7,33,34,39)</sup>.

**Mastitis:** Es el factor más importante que provoca un aumento de los recuentos de células. Si la infección es eliminada, el recuento de células disminuirá para retornar a su nivel normal, si los leucocitos son incapaces de eliminar los organismos, se crea una infección subclínica <sup>(7)</sup>.

**Edad de la vaca:** Las vacas viejas tienden a tener recuentos de células más elevados. Esto por que las infecciones crónicas, serán más frecuentes simplemente por ser mayor el tiempo de exposición de la ubre a los organismos durante las lactaciones anteriores. O bien los conductos de los pezones pueden estar dañados permitiendo que las bacterias entren más fácilmente en la glándula mamaria <sup>(7)</sup>.

**Fase de lactación:** Los recuentos de células son con frecuencia altos durante los primeros siete a diez días después del parto aunque es posible que esto no ocurra en todas las vacas <sup>(7)</sup>.

Queda bien establecido que el conteo de células somáticas en vacas “sanas” es alta en el parto, más baja desde la cúspide de la lactación a la mitad de la misma y más elevada en el momento del secado <sup>(33)</sup>.

**Estación de año:** Aunque no sucede en todos los hatos, se ha encontrado que durante el verano aumenta el número de células somáticas, esto puede explicarse por

varios factores 1) Efecto de la concentración debido a una menor producción de leche, 2) La tensión causa una menor capacidad de las células blancas para combatir los microorganismos invasores, 3) un aumento de organismos causantes de mastitis debido a una mayor temperatura y humedad ambiental; y 4) una menor eficacia de los sistemas inmunológicos de las vacas cuando están bajo mayor tensión causada por las temperaturas y humedad altas <sup>(33)</sup>.

Un ordeño al día: En algunas partes del mundo, sólo se ordeñan a las vacas una vez al día cerca del final de la lactación. Esto puede causar un incremento en el conteo de células, aun en ausencia de infección. La razón es que el procedimiento acelera el proceso de involución de la ubre o la transición a la fase no lactante <sup>(33)</sup>.

Tamaño del hato: Los hatos grandes tienden a tener conteos celulares menores que los hatos pequeños. Esto puede explicarse por el hecho de que algunos hatos pequeños pueden carecer de calidad de manejo presente en hatos grandes y la producción láctea tiende a ser mayor en hatos grandes, esto usualmente es acompañado de un menor conteo de células somáticas <sup>(33)</sup>.

Localización geográfica: Las cuentas celulares tienden a ser mayores en regiones en las que la temperatura y humedad son más altas <sup>(33)</sup>.

Congelado y descongelado de muestras: El congelado y descongelado de muestras de leche a intervalos de 1 a 28 días resulta en una reducción en el conteo de células, aunque ésta puede ser relativamente pequeña cuando las células son contadas con un contador electrónico <sup>(33)</sup>.

Momento del día: En los hatos que son ordeñados dos veces al día, se ha encontrado una aumento en el CCS durante el ordeño de la tarde, esto porque el intervalo entre ordeños, es más corto en el de la tarde, que resulta en la concentración de células somáticas en un menor volumen de leche <sup>(33)</sup>.

Nivel de producción láctea: El conteo de células es menor en hatos con mayor producción láctea debido a que los hatos con mayor producción con frecuencia tienen un

mejor manejo y ponen más atención a la aplicación conciente de los procedimientos recomendados para prevenir y controlar la mastitis <sup>(33)</sup>.

Tetas pisoteadas o Ubres lesionadas: Estas resultan en inflamación dentro de la glándula mamaria afectada, lo que causa un incremento en el conteo de células somáticas <sup>(33)</sup>.

Presencia de otras enfermedades: Cualquier enfermedad de las vacas lecheras, especialmente aquellas que causan alteraciones sistémicas tienen el potencial para causar una cuenta celular elevada en la leche <sup>(33)</sup>. Aunque tales situaciones son relativamente raras, se ha demostrado que la prevalencia de mastitis subclínica, la cual a su vez eleva el recuento de células somáticas, esta asociada de manera estadísticamente significativa a la prevalencia de brucelosis <sup>(46)</sup>.

### **Brucelosis bovina**

La brucelosis es una causa importante del fracaso reproductivo en los animales domésticos, y un problema para la ganadería nacional, ya que ocasiona aborto e infertilidad, disminuye la producción láctea e interfiere en los programas genéticos <sup>(18,31)</sup>.

Produce pérdidas económicas cuantiosas para el sector pecuario, debido en parte a que es una barrera no arancelaria de tipo sanitario que influye de manera negativa en el comercio de animales y sus productos con otros países <sup>(9)</sup>, siendo estos efectos particularmente apreciables en los países en vías de desarrollo debido a que afecta la reproducción y la productividad en los animales <sup>(6,,42)</sup>.

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa de origen bacteriano que afecta a los animales mamíferos domésticos y silvestres, y es una de las zoonosis difundida ampliamente en el mundo <sup>(31,42)</sup>. En México, según la secretaría de salud, se registran anualmente un promedio de 6,500 casos de brucelosis humana. Esta cifra representa solo los casos registrados de pacientes que demandan atención médica, por lo que se considera que sólo representa el 30% de la población afectada <sup>(9)</sup>. La brucelosis es una enfermedad considerada de distribución mundial. Sin embargo en algunos países los

programas de control y erradicación, han permitido la eliminación total, como es el caso de Inglaterra, Noruega, Suecia, Dinamarca y Finlandia <sup>(37)</sup>

Debido al impacto que tiene la enfermedad sobre la población humana, en México se llevó a cabo una encuesta serológica, para determinar la prevalencia de la brucelosis bovina en 1952. En 1970 se puso en marcha un programa permanente, que tomó carácter de oficial en 1981 estableciéndose la Campaña Nacional contra la brucelosis en los animales. En septiembre de 1993, se forma la Comisión Nacional para la Erradicación de la Tuberculosis y Brucelosis (CONETEB), que da lugar a la campaña contra la brucelosis, que planificada en varias etapas propone como estrategia hacer más efectiva y expedita la constatación de hatos libres. Pero es hasta 1996 que se publica la Norma Oficial Mexicana (NOM) para regularla <sup>(18,31,32)</sup>.

### **Agente etiológico**

El organismo causante de la brucelosis es un cocobacilo del género *Brucella*, con un tamaño de 0.6mm a 1.5mm de largo por 0.5mm a 0.7mm de ancho. Por lo general aparecen aislados o en pares, pero a veces se ven en cadenas cortas o en grupos, son gram negativas, no tienen cápsula y son móviles. Es un patógeno intracelular facultativo ya que se multiplica en los fagocitos del sistema inmune. El género *Brucella* no se desarrolla en medios de cultivo que contengan solamente peptonas; se requiere de triptosa o tripteína y algunas veces suplementos tales como infusión de hígado, suero de bovino o hidrolizado de levadura <sup>(29,32)</sup>.

Existen seis especies de *Brucella* asociadas a sus reservorios naturales: *Brucella abortus* es bovinos, *B. suis* en cerdos, *B. mellitensis* en caprinos, *B. ovis* en ovinos, *B. canis* en perros, *B. neotomae* en rata del desierto, y también se ha encontrado *B. maris* en mamíferos marinos. Sin embargo se sabe que no son específicos de estas especies y que otras especies se pueden contagiar si llegan a estar en contacto con tejidos o material contaminado de animales infectados <sup>(1,18,41)</sup>.

Las brucelas son medianamente resistentes a los factores del medio, su resistencia disminuye cuando aumentan la temperatura y la humedad; son muy sensibles a la luz solar, a temperaturas superiores a 55°C, no resiste la pasteurización; las radiaciones

ionizantes, los desinfectantes comunes y la sequedad extrema inhiben su reproducción; resisten la congelación, el ahumado así como a una amplia gama de antibióticos <sup>(40)</sup>.

### **Patogenia.**

De manera natural el microorganismo logra su entrada al cuerpo del animal como resultado de la ingestión de alimento, agua y leche contaminada posterior al parto o aborto; además las vacas tienen el hábito de lamer las membranas fetales, fetos y terneros recién nacidos, así como lamer los genitales de otras hembras cuando están en la fase de estro <sup>(40)</sup>.

La transmisión venérea puede ocurrir pero es rara, debido a que la eliminación a través del espermatozoide solo ocurre en casos de sementales con orquitis y epididimitis. También existe transmisión conjuntival y por laceraciones en la piel <sup>(22,23,29)</sup>.

Después de la infección inicial, se produce localización en los nódulos linfáticos regionales, luego hay propagación a otros tejidos: bazo y nódulos mamarios e iliacos, donde persiste por largos periodos y constituye una fuente de reinfección. *Brucella abortus* tiene predilección por el útero grávido, ubre, testículos y glándulas sexuales masculinas accesorias, nódulos linfáticos, cápsulas articulares y bolsas, en la ubre se desarrolla abundantemente brucela y se eliminan con la leche durante el periodo de lactancia, siendo en este tejido donde se mantienen activas en los intervalos de las gestaciones <sup>(37)</sup>.

El signo clínico más predominante es el aborto en el último tercio de la gestación o el nacimiento de becerros débiles. La retención de placentas y endometritis es común, dando como consecuencia infertilidad. En machos los signos principales son orquitis y epididimitis <sup>(37)</sup>.

Otros signos que se pueden presentar son anorexia, decaimiento, baja en la producción láctea hasta en un 25%, repetición de calores y disminución de la libido. Ocasionalmente se observan higromas, artritis, adherencias y fibrosis de los testículos que causan infertilidad permanente <sup>(10,11)</sup>.

La enfermedad se hace más evidente en hembras que en machos, y afecta más a gestantes que a novillonas, se cree que es debido a la presencia de eritritol, que es un polisacárido, por el cual la brucela tiene marcado tropismo, si la infección se da a edades tempranas, los signos clínicos se manifiestan hasta que la vaca está gestante. Mientras tanto la *Brucella* se localiza en la ubre donde produce mastitis intersticial y afecta los linfonodos adyacentes. También se puede localizar en hígado, pulmón, linfonodos y bazo donde se producen focos granulomatosos<sup>(37)</sup>.

Las lesiones en fetos abortados son edema y excesivo líquido subcutáneo, pero son pocas las lesiones distintivas, en la placenta existe necrosis de los cotiledones y están recubiertos por un exudado oscuro<sup>(40)</sup>.

Las vacas quedan infectadas de por vida, la bacteria es fácilmente fagocitada por los macrófagos, pero resiste la destrucción posterior por ser un microorganismo intracelular facultativo, permanece a salvo de los mecanismos de defensa por largos periodos pudiéndose multiplicar dentro del fagocito, esta relación huésped-parásito es muy compleja y debido a esto el periodo de incubación es variable y está influenciado por la fase de gestación, número y virulencia de las bacterias, edad y vacunaciones previas. Thomsen encontró que el periodo de incubación varía de 53 a 253 días, la incapacidad de detectar animales infectados en periodo de incubación, es el problema más grave en la persistencia de la infección en los establos y de la diseminación de la misma hacia otras instalaciones<sup>(12,22,29,35)</sup>.

Dada la persistencia en el organismo infectado y la resistencia de éste al tratamiento, se recomienda el sacrificio de los animales infectados, pues no se garantiza el éxito del tratamiento primario, además de que resulta costoso y poco práctico.

### **Prevención.**

Las medidas de prevención control se basan por lo general en la aplicación de uno o más puntos que se mencionan: vacunación, eliminación de animales enfermos, y prácticas de manejo orientadas a reducir riesgos de infección<sup>(37)</sup>, como pueden ser: desinfección de locales, corrales, etc. Así como evitar la movilización de animales infectados<sup>(32)</sup>.

Aunque la vacunación disminuye la aparición de la enfermedad es necesario desarrollar un plan de manejo especial para el hato infectado por brucelosis, lo cual implica la aplicación de medidas de control y erradicación de la enfermedad; cuyo objetivo es controlar, reducir y eliminar la brucelosis del hato, así como prevenir su transmisión dentro y fuera de la explotación al tiempo que se aumenta la inmunidad del hato<sup>(25)</sup>.

Los puntos básicos que debe incluir el plan del hato son:

1) Vacunación:

Para bloquear la transmisión, se debe vacunar un número suficiente de susceptibles tal que en promedio por caso primario de infección genere menos de un caso secundario, y se logra teniendo programas de vacunación por periodos largos<sup>(21)</sup>.

En el caso de la brucelosis; actualmente el método de inmunización utilizado es la vacuna RB51 que ha venido a sustituir a la vacuna Cepa 19, debido a que el ser una cepa rugosa carece de cadena "O" de LPS, y por lo tanto no hay aglutinación en el suero de animales vacunados con esta cepa. Además la eficacia de la vacuna en condiciones naturales es superior al 80% y como cualquier vacuna, depende del estado general de salud de los animales el nivel de respuesta<sup>(25)</sup>.

La Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995 Campaña nacional contra la brucelosis de los animales establece: "las vacunas utilizadas para la inmunización de bovinos deben estar elaboradas con la Cepa 19 de *Brucella abortus* u otra que autorice la secretaría". Desde 1997 la secretaría autorizó la producción, comercialización y distribución de la vacuna RB51 para la prevención de la brucelosis en todo el territorio nacional<sup>(35)</sup>.

Por conveniencia y seguridad se han establecido 2 dosis de la vacuna de acuerdo a la edad de los animales a aplicarse:

Dosis becerras: Para hembras de 3-12 meses 1 a  $3 \times 10^{10}$  UFC por dosis de 2 ml con variación permitida de  $\pm 0.3$  de logaritmo<sup>(25)</sup>.

Dosis vacas: Para hembras mayores de 12m, que contiene  $1 \times 3 \times 10^5$  UFC por dosis de 2ml con variación permitida de  $\pm 0.3$  de logaritmo<sup>(25)</sup>.

Está comprobado que una sola dosis de vacuna en la vida del animal confiere una protección adecuada. Sin embargo es recomendable aplicar una revacunación a los 12 meses posteriores a la primera aplicación en zonas con carga infectante alta. También se recomienda aplicar en brotes de aborto, debido a que en animales gestantes, disminuye el riesgo de abortar y limita la eliminación de brucelas patógenas al ambiente<sup>(25)</sup>.

## 2) Manejo de reemplazos:

Se recomienda separación, aislamiento y prueba de todo animal vivo. Se sabe que la fuente más frecuente de infección fue un animal externo “reemplazo” es un hecho que una vez que el hato ha sido “limpiado”, o que está en fase de serlo, un punto importante es el monitoreo de los reemplazos<sup>(21)</sup>.

El riesgo de brucelosis es directamente proporcional al número de ingresos de nuevos animales, por lo tanto el riesgo también está asociado a la fuente de los reemplazos y a la historia de muestreo serológico y vacunaciones del hato de origen de esos reemplazos<sup>(21)</sup>.

## 3) Manejo de crianza:

Cuando los reemplazos son de cría, se debe tomar en cuenta el fenómeno de “resistencia inmunológica”, que se refiere al hecho de que durante el período de incubación de la enfermedad es muy difícil hacer el diagnóstico serológico; de hecho se sabe que alrededor del 20% de las hijas de madres rectoras pueden permanecer seronegativas desde el momento del nacimiento hasta que están por parir, que es cuando manifiestan un aborto o algún otro problema reproductivo y se tornan seropositivas independientemente de que hayan sido vacunadas cuando beceras<sup>(21)</sup>.

Como es prácticamente imposible identificar ese 20% es necesario hacer seguimiento de hijas rectoras por 24 meses, como lo recomienda la NOM o bien castrarlas y destinarlas a engorda y a matadero<sup>(21)</sup>.

#### 4) Manejo del hato:

El control de brucelosis en un hato se facilita más si existe lotificación, es un hecho que al dividir el hato en dos lotes iguales se reduce la exposición relativa a la infección en un 50%. De ahí una recomendación obvia, pero no siempre presenta es la de separar vacas secas y vacas en producción<sup>(25)</sup>.

Así mismo observar algunas prácticas básicas de saneamiento como lo es ordeñar a las seropositivas al final de la línea, lo que necesariamente implica el lavar y desinfectar las mamilas y el equipo después de cada ordeño<sup>(25)</sup>.

#### 5) Muestreo serológico:

Entre las bases generales para el control y prevención de la brucelosis bovina se encuentran la identificación y eliminación de los animales infectados, aunado a programas de vacunación<sup>(30)</sup>. El realizar muestreos en poblaciones afectadas facilita la toma de decisiones en cuanto a la eliminación de positivos<sup>(25)</sup>.

Para fines prácticos, las pruebas diagnósticas pueden dividirse en:

##### 1. Pruebas de Tamiz o “screening”

Este tipo de pruebas se caracterizan porque poseen una alta sensibilidad, lo que significa que pocos o ningún animal falso negativo resulta de su realización. Además suelen ser pruebas sencillas, económicas y prácticas. Dentro de este grupo se incluyen la prueba de tarjeta o rosa de bengala, la cual se puede realizar en el total de los animales de un hato; todos los sueros que resulten positivos, deben pasar a una prueba complementaria<sup>(44)</sup>.

##### Prueba de tarjeta o rosa de bengala:

Es la prueba de rutina para diagnóstico de brucelosis, es rápida y sencilla, solo necesita el suero y un test comercial para realizarla pero solamente es cualitativa y a veces puede darnos muchos falsos positivos<sup>(13)</sup>. Con esta prueba se detecta la presencia de anticuerpos circulantes en la sangre<sup>(16)</sup>.

##### 2. Pruebas complementarias

Estas sirven para resolver problemas como: eliminación o disminución de las reacciones heteroespecíficas; detección de anticuerpos “incompletos”; diagnóstico corecto del mayor

número de casos, especialmente de los crónicos, que suelen permanecer con diagnóstico incierto; diferenciación de títulos residuales debido a vacunación o a infección. Estas pruebas se aplican en hatos problema; donde la infección persiste pese a la aplicación de exámenes serológicos y a una eliminación rigurosa de reactores. Entre estas se incluyen la prueba de rivanol y la prueba de fijación de complemento<sup>(44)</sup>.

#### Prueba de Rivanol:

Se basa en que el rivanol tiene la habilidad de precipitar las proteínas del suero bovino, entre ellas las aglutininas “no específicas”. Mediante el uso de cantidades iguales de suero y de solución al 1% de rivanol, queda un precipitado y su sobrenadante, de este sobrenadante se detecta exclusivamente las IgG, sin embargo para que la prueba pueda ser efectiva se emplea un antígeno de *Brucella abortus* especial, que es altamente sensible, con el fin de compensar el efecto de la dilución de anticuerpos. Es una prueba complementaria a la prueba de tarjeta, es de tipo cuantitativa, sin embargo es muy laboriosa, se necesita de una centrifuga para realizarla y puede llegar a dar resultados falsos<sup>(13)</sup>.

### 3. Pruebas de vigilancia epizootologica

En este grupo se incluye la prueba de anillo en leche, la cual se recomienda en áreas controladas y libres de infección para descubrir hatos presuntamente infectados<sup>(44)</sup>.

La calendarización de los muestreos dependerá del grado de afectación que presente la explotación a mayor sospecha de la presencia de la enfermedad mayor frecuencia en el muestreo serológico:

1. Cada 15 días en hatos afectados con aborto.
2. Cada 30 días en hatos afectados sin aborto.
3. Cada 60 días en hatos limpios.

Una vez que el muestreo resulte negativo a las pruebas serológicas, se debe establecer un muestreo periódico para monitorear aun en ausencia de positivos.

Las pruebas de fijación del complemento y tarjeta si diferencian los animales infectados de los vacunados con vacuna RB51 a diferencia de los vacunados con Cepa 19<sup>(25)</sup>.

Es por ello que en la cuenca lechera de Tizayuca, estado de Hidalgo, se utiliza para la inmunización contra brucelosis, la vacuna RB51, y periódicamente se realizan muestreos serológicos en todos los establos.

El conteo de células somáticas y la Brucelosis, como ya mencionamos son dos factores muy importantes en la producción y comercialización de leche y sus subproductos, por ello es importante poner atención en su control. Durante el periodo en que preste mi servicio social en la Cuenca lechera de Tizayuca, se observó que en ciertos establos había un número elevado de células somáticas en la leche, sin embargo estos no presentaban mastitis, pero en los muestreos serológicos se encontraban altos en la presencia de animales positivos a brucelosis, por lo que se decidió hacer un análisis del grado de asociación entre el número de células somáticas en leche y la seroprevalencia de brucelosis.

## **OBJETIVOS**

### OBJETIVOS GENERALES:

Realizar muestreo y pruebas serológicas para determinar si los hatos son libres, sospechosos o positivos a *Brucella sp.*

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Determinar el grado de asociación entre el número de células somáticas en tanque frío y la seroprevalencia de brucelosis bovina.

### OBJETIVOS ACADÉMICOS:

Poner en práctica los conocimientos adquiridos durante la carrera para la obtención y manejo de muestras, así como para la realización de la prueba microscópica directa y tarjeta.

### OBJETIVOS SOCIALES:

Brindar asesoría a los ganaderos considerando y analizando la información sobre la cantidad de células somáticas en leche y correlacionando con el índice de prevalencia de brucelosis en cada establo.

Mostrándole al ganadero que la presencia de brucelosis en los hatos tiene una repercusión directa en la producción de leche.

## **CUADRO METODOLÓGICO**

El presente estudio fue realizado en el complejo agropecuario Industrial de Tizayuca (CAIT), el cual se ubica al sur del estado de Hidalgo en el municipio de Tizayuca, en el kilómetro 57 de la carretera México-Pachuca a una altitud de 2200 msnm. Este complejo encuentra localizado en las coordenadas 19°51'25" latitud norte y 98°59'8" longitud oeste con un clima BS1 Kw (Según Koeppen, tipo semiseco, templado con lluvias en verano), con una precipitación pluvial anual de 624.9 mm y una temperatura media anual de 16.3°C.

En dicho complejo existen 126 establos y albergan una población de 27,000 cabezas de ganado lechero, en su gran mayoría de la raza Holstein, Fresian, siendo una población promedio por establo de 220 cabezas.

Del total de los establos sólo se trabajó con 82 de ellos debido a la negación de algunos ganaderos para la obtención de muestras. De los 82 establos en cuestión 10 tienen 2 tanques y uno 3 tanques, estos se trabajaron como muestras diferentes, aunque eran del mismo establo.

- Se tomó una muestra de leche de tanque frío de los hatos en estudio cada semana, durante cuatro semanas, a dicha muestra se le practicó el conteo de células somáticas mediante la técnica microscópica directa basada en la prueba de la FDA (anexo 1).

### **PRUEBA DE MICROSCOPIA DIRECTA PARA EL CONTEO DE CÉLULAS SOMÁTICAS**

*Food and Drug Administration*

1. Identificar el portaobjetos con una marca legible e indeleble.
2. Agitar la muestra 25 veces por 7 segundos a una amplitud de movimiento de 30 cm.
3. Tomar con la micropipeta 10 microlitros de la muestra de leche.
4. Secar la parte externa de la punta de la micropipeta con una toalla de papel teniendo mucho cuidado de no tocar con el papel el orificio de dicha punta.

5. Depositar los 10 microlitros dentro del círculo del portaobjetos (dentro del área de 1 cm cuadrado)
6. Esparcir los 10 microlitros de leche con una aguja de disección en toda el área de 1 cm cuadrado sin salirse del círculo, con la finalidad de hacer un frotis de leche.
7. Secar a 37.5 centígrados en la estufa bacteriológica, durante 10 minutos.
8. Transcurrido el tiempo sacar el frotis de la estufa, y dejar enfriar durante 1 minuto.
9. Fijar con metanol absoluto 2 minutos.
10. Escurrir el metanol y cubrir con una solución de Xilol-metanol (vol/volumen) 2 minutos, con la finalidad de desengrasar la muestra.
11. Drenar el xilol-metanol.
12. Cubrir el frotis con el colorante de Wright-Leisman durante 3 minutos.
13. Añadir sobre el colorante el amortiguador de fosfatos y dejar 3 minutos.
14. Escurrir y lavar con agua corriente a chorro débil.
15. Dejar secando a temperatura ambiente.

#### Observación al microscopio

1. Una vez que se ha secado el frotis teñido, colocarlo en la platina del microscopio y enfocar con el objetivo 10x el borde de un extremo del diámetro del frotis.
2. Repetir esta misma operación pero ahora enfocando con el objetivo 40x y nuevamente enfocar el borde del extremo del diámetro.
3. Agregar aceite de inmersión y enfocar con el objetivo 100x.
4. Mover el campo en forma diametral hacia el otro extremo de dicho diámetro y contar cada célula con núcleo que vaya apareciendo; evitando contar células menores de 4 micras, o fragmentos de células. Los fragmentos celulares serán contados si más del 50% del material nuclear es visible.
5. Una vez que se llega al otro extremo y que se tiene la cuenta total de células encontradas, registrar dicha cuenta.
6. La cuenta obtenida debe ser multiplicada por el factor de campo del objetivo de inmersión (FCOI), y el resultado equivale al número de células somáticas por mililitro de leche de la muestra.

#### Cálculo del factor de campo del objetivo de inmersión (FCOI)

1. Usando un medidor especial, medir el diámetro de campo del lente del objetivo de inmersión, en milímetros (D).

2. Sustituir este valor en la siguiente fórmula :  $FCOI = 10,000 / (11.28 \times D)$

- Simultáneamente al muestreo de leche de tanque frío, a cada establo en estudio se le tomó una muestra de sangre por personal del departamento de salud animal de la cuenca lechera de Tizayuca, Hidalgo.
- De cada muestra recolectada se obtuvo suero sanguíneo para la realización de la prueba de tarjeta, que se hace rutinariamente para analizar la seroprevalencia de la brucelosis en los hatos.

## PRUEBA DE TARJETA

*Diagnóstico serológico de brucelosis y su interpretación. SARH.*

1. El antígeno está constituido por células de *B. Abortus* (99S) teñidas con colorante rosa de bengala, suspendidas en un regulador a pH 3.6 que debe mantenerse a 4°C mientras no está en uso.
2. Antes de comenzar la prueba, tanto los sueros como el antígeno debe alcanzar la temperatura del laboratorio (20°C)
3. Se emplea una placa de vidrio limpia y desengrasada, con una cuadrícula marcada de 5 x 10 cuadros de 3cm<sup>2</sup>.
4. En el primer cuadro se colocan 0.03 ml del suero problema y 0.03 ml del antígeno rosa de bengala y se homogeniza la suspensión con un palillo de madera. El resto de los cuadros se siguen ocupando para otros sueros problema, pero siempre reservando 2 de ellos para un suero testigo positivo y uno negativo.
5. Se agita la placa con movimientos rotatorios durante 4 minutos y frente a una lámpara (aglutinoscopio) se observa en busca de la formación de grumos (aglutinación).
6. Primero se buscan los testigos en busca de la reacción esperada correspondiente. En caso de no encontrarse se desecha la prueba y se cambia el antígeno o el lote.
7. Los resultados se interpretan como sigue:
8. Cualquier tipo de aglutinación ..... positivo.
9. No aglutinación ..... negativo
10. La prueba tiene validez cualitativa y se invalida el resultado si se lee pasados los 4 minutos, particularmente si se seca la muestra.

- Los sueros que resultaron positivos fueron sometidos a la prueba de Rivanol, Que es una prueba serológica complementaria cuantitativa, altamente específica, ya que se basa en la precipitación selectiva de las IgM en el suero por el reactivo de rivanol.

## PRUEBA DE RIVANOL

*Diagnóstico serológico de brucelosis y su interpretación. SARH.*

1. El precipitado se retira por centrifugación y con el sobrenadante se realiza una aglutinación en placa.
2. El reactivo de rivanol (lactato de 2-etoxi-6,9-diamino acridina) es un derivado del naranja de acridina, que una vez preparado, debe guardarse en un recipiente estéril y conservarse en refrigeración a 4°C protegido contra la luz.
3. Los sueros sospechosos al igual que el antígeno deben sacarse del refrigerador cuando menos 30 a 60 minutos antes de realizar la prueba, con el propósito de que ambos estén a la misma temperatura del laboratorio al momento de realizar la prueba.
4. Se depositan 0.4 ml de solución de rivanol en un tubo por cada muestra.
5. Se agrega a cada tubo 0.4 ml de suero.
6. Mezclar de inmediato por agitación del tubo, evitando que el contenido entre en contacto con la piel.
7. Dejar reposar los tubos a temperatura ambiente por espacio de 20 a 30 minutos.
8. Centrifugar aproximadamente a 2000 rpm por 5 minutos para obtener un paquete a partir del precipitado.
9. Se mide del sobrenadante 0.08, 0.04, 0.02, 0.01 y 0.005 ml, Se coloca cada una de dichas cantidades en un cuadro de la placa de vidrio, procurando llevar un orden de izquierda a derecha y de arriba a abajo, dejando un cuadro sin utilizar entre las cinco gotas de una muestra y de las de otra.
10. Se agrega 0.03 ml del antígeno a cada una las gotas sobre la placa.
11. Mezclamos con palillos de madera, extendiendo cada muestra 2 cm de diámetro aproximadamente.
12. Se mezcla por rotación inclinando la placa suavemente hacia un lado y a otro 4 veces. Y se deja reposar 6 minutos.

13. Mover la placa nuevamente por rotación suave 4 veces y dejar reposar otros 6 minutos.
14. Al término del tiempo, agitar la placa por rotación 4 veces más y proceder a realizar la lectura sobre el aglutinoscopio.
15. Las diluciones corresponden con los títulos como sigue:

<b>Volumen de la gota (ml)</b>	<b>Dilución</b>	<b>Volumen de la gota (ml)</b>	<b>Dilución</b>
0.080	1:25	0.010	1:200
0.040	1:50	0.005	1:400
0.020	1:100		

16. Interpretación de resultados:

La prueba se considera positiva cuando hay aglutinación de cualquier grado.

La prueba se considera negativa cuando no existe aglutinación.

En animales no vacunados se considera positiva una aglutinación igual o mayor a 1:25 y en animales vacunados se considera positiva una aglutinación igual o mayor a 1:50

- Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis de correlación bivariada de Pearson, por medio de Excel, para determinar el grado de asociación entre ambos eventos.
- Por medio del método de los mínimos cuadrados, se determinó el coeficiente de regresión para establecer una medida predictiva de la relación entre el porcentaje de brucelosis en el hato y el aumento en el conteo de células somáticas en la leche de este.

- 1.
- 2.

3.

4.

### 5. DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES

El trabajo en el laboratorio comenzó en abril de 2004, durante este mes y el siguiente sólo se realizó prueba de tarjeta debido a que se esperaba el material especial para la prueba de células somáticas por microscopía directa.

Durante este periodo la calendarización fue la misma:

HORARIO	ACTIVIDAD
Lunes a Viernes 8:00-16:00hrs	Recepción y realización de pruebas de tarjeta y rivanol.

Una vez que llegó el material se modificó un poco el horario

HORARIO	ACTIVIDAD
Lunes a viernes 8:00-12:00hrs	Recepción y realización de pruebas de tarjeta y rivanol
Lunes a viernes 12:00-14:00hrs	Recepción de muestras de leche de tanque frío
Lunes a viernes 14:00-16:00hrs	Realización de pruebas de CCS por microscopía directa.

## RESULTADOS, EVALUACIÓN Y ANÁLISIS

Una vez que se realizaron las pruebas en suero se procedió a sacar el porcentaje de prevalencia de brucelosis por establo. En cuanto al conteo de células somáticas se transformo el resultado a logaritmo 10 para poder realizar los cálculos de estimación. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla de resultados 1.

El resultado obtenido por medio de Excel del coeficiente de correlación es de 0.3006, con una significancia de 0.003. Los datos anteriores, quieren decir que existe una correlación de 30% entre la presencia de brucelosis en los hatos y el aumento en el conteo de células somáticas.

Una vez que se obtuvieron los resultados de la correlación y observando que, en efecto existe una relación significativa entre ambos eventos, se procedió a determinar la ecuación de estimación.

La ecuación de estimación nos permite predecir la relación entre el porcentaje de brucelosis en un hato y conteo de células somáticas que esperamos tener en éste, además de que nos permite ajustar la línea de regresión para fines gráficos.

Para obtener la ecuación de regresión que describa dicha relación es necesario sustituir la siguiente formula:  $Y = a + b X$

Sin embargo para poder sustituir la formula anterior fue necesario trabajar con el método de los mínimos cuadrados para obtener los valores de: a y b. Primero para obtener el valor de b, se utilizó la ecuación de la pendiente de la línea, debido a que este dato se necesita para obtener el valor de a mediante la formula de la intersección en Y. Una vez que se realizaron los cálculos mencionados se obtuvo que:  $a = 5.6138$  y  $b = 0.007$ .

Para predecir el número de células somáticas que esperamos encontrar en un hato con determinado porcentaje de brucelosis, solo tenemos que sustituir de la ecuación  $Y = a + b X$ ; a y b con los valores obtenidos anteriormente y X con el porcentaje de brucelosis que existe.

En el presente trabajo se substituyeron los valores de X con el porcentaje de prevalencia de brucelosis que se encontró en los hatos en estudios y se obtuvo la gráfica de la figura 1.

Además se hizo una comparación entre los datos obtenidos realmente y la estimación que se obtuvo mediante la ecuación de regresión, los datos obtenidos se presentan en la tabla de resultados 2. Donde podemos advertir que los resultados reales (Y) y los resultados de la estimación (Y) no son iguales; sin embargo se tomaron como válidos, debido a que al realizar el cálculo del error estándar de la estimación, todos los resultados entran en el rango permitido.

Aunque la ecuación de estimación no es un predictor perfecto, la regresión si nos da una idea clara del conteo de células somáticas que esperamos obtener según el grado seroprevalencia de brucelosis en los hatos.

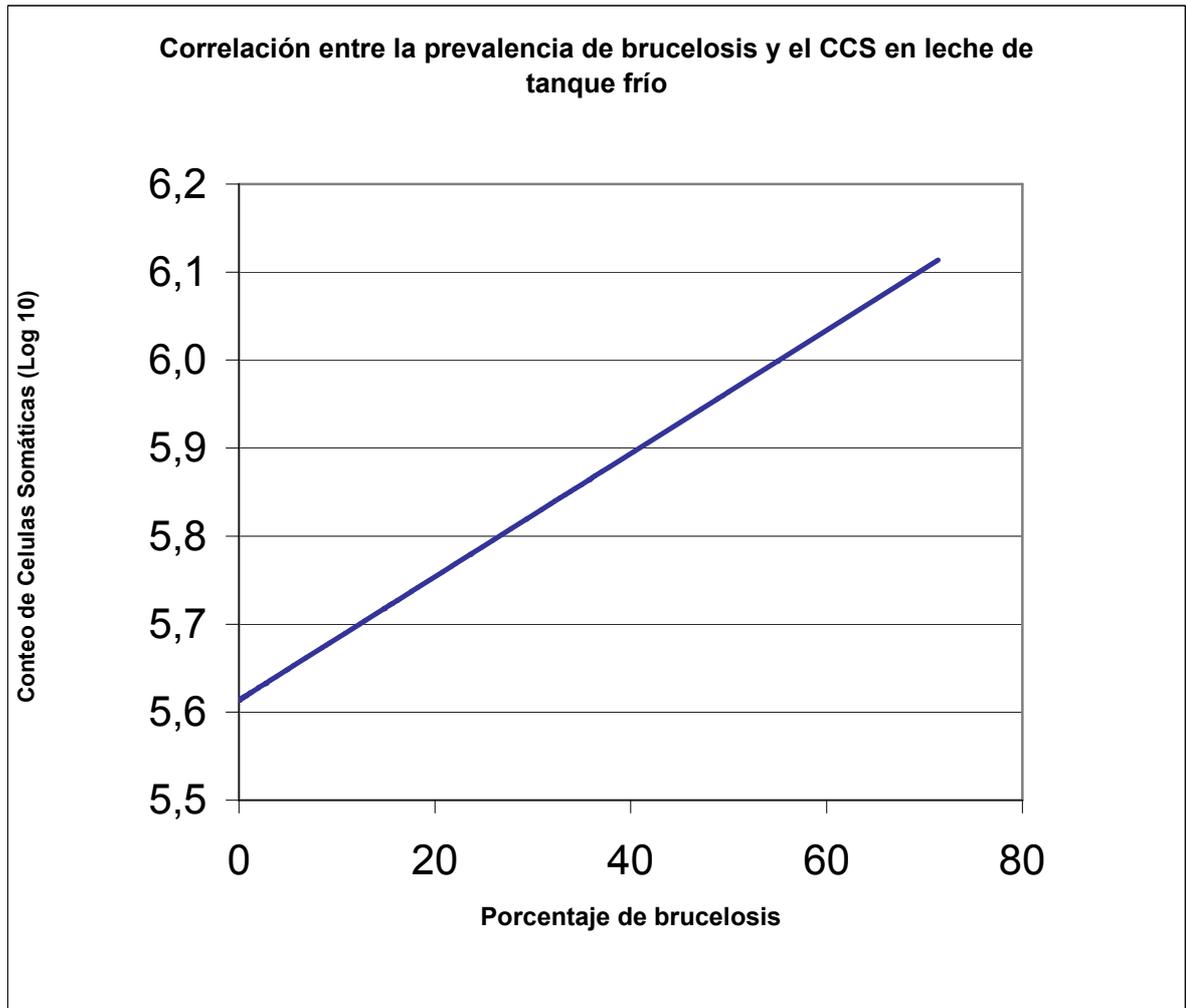
Sin embargo, al realizar la ecuación de estimación nos encontramos con que algunos datos de baja prevalencia de brucelosis mantenían un conteo alto de células somáticas, esto es por que la brucelosis no es la única enfermedad que se manifiesta con elevadas cuentas de células somáticas, de hecho la principal enfermedad que nos da conteos elevados de células somáticas es la mastitis

Resultados de porcentaje de brucelosis y conteo de células somáticas por hato

No.	Porcentaje Brucelosis	CCS/ml	CCS LOG 10
1a	0	297,970.97	5.47
1b	0	290,583.56	5.46
2	0	214,243.59	5.33
3	0	1,083,533.08	6.03
4a	0	581,166.52	5.76
4b	0	290,583.26	5.46
4c	0	975,177.72	5.99
5a	0	3,743,310.64	6.57
5b	0	236,406.72	5.37
6a	0	256,107.28	5.41
6b	0	187,155.32	5.27
7a	0	242,973.57	5.39
7b	0	290,583.26	5.46
8	0	517,139.70	5.71
9	0	300,433.54	5.48
10	0.31	1,044,129.68	6.02
11	0.32	221,631.30	5.35
12a	0.4	125,591.07	5.10
12b	0.4	236,406.72	5.37
13	0.6	273,345.27	5.44
14	0.61	482,663.72	5.68
15a	0.71	83,727.38	4.92
15b	0.71	556,540.82	5.75
16	1.05	364,460.36	5.56
17	1.07	231,481.58	5.36
18	1.12	1,753,349.84	6.24
19	1.2	270,882.70	5.43
20	1.26	531,915.12	5.73
21	1.28	329,984.38	5.52
22	1.99	137,903.92	5.14
23	2.02	261,032.42	5.42
24	2.68	648,476.76	5.81
25a	2.72	310,283.82	5.49
25b	2.72	802,797.82	5.90
26	2.73	1,113,081.64	6.05
27	3.21	103,427.94	5.01
28	3.8	300,433.54	5.48
29	4.84	152,679.34	5.18
30	4.95	325,059.24	5.51
31	5	221,631.30	5.35
32	5.6	430,949.75	5.63
33	6.85	1,374,114.06	6.14
34	8.51	413,711.76	5.62
35	8.86	581,166.52	5.76
36	9.24	379,235.78	5.58
37	10.8	152,679.34	5.18

No.	Porcentaje Brucelosis	CCS/ml	CCS LOG 10
38	12.36	2,290,608.02	6.36
39	12.84	1,369,188.92	6.14
40	14.81	438,337.46	5.64
41a	14.81	1,379,039.20	6.14
41b	14.81	1,388,889.48	6.14
42	15.38	2,633,494.99	6.42
43	15.55	792,947.54	5.90
44	15.67	694,444.74	5.84
45	16.15	728,920.72	5.86
46	16.2	344,759.80	5.54
47	17.6	359,535.22	5.56
48	17.63	549,153.11	5.74
49	18.25	246,257.00	5.39
50	20.81	423,562.04	5.63
51	21.74	3,147,164.46	6.50
52	22.13	300,433.54	5.48
53	23.63	389,086.06	5.59
54	23.64	876,674.92	5.94
55	24.84	1,206,659.33	6.08
56	25.93	287,299.83	5.46
57	26.85	760,113.27	5.88
58	27.78	551,615.68	5.74
59	29.38	2,782,704.10	6.44
60	29.38	349,684.94	5.54
61	30.89	349,684.94	5.54
62	31.82	54,669,054.00	7.74
63	32.22	300,433.54	5.48
64	32.75	339,834.66	5.53
65	33.33	494,976.57	5.69
66	33.85	918,538.61	5.96
67	34.32	904,584.04	5.96
68	34.96	6,451,933.34	6.81
69a	35.73	849,586.65	5.93
69b	35.73	709,220.16	5.85
70	35.98	340,060.57	5.53
71	36.07	1,436,499.16	6.16
72	36.36	504,005.99	5.70
73	37.04	438,337.46	5.64
74	37.8	362,818.64	5.56
75	40.33	842,198.94	5.93
76	47.15	295,508.40	5.47
77	48.79	512,214.56	5.71
78	48.98	572,957.95	5.76
79	49.41	1,292,849.25	6.11
80	50	704,295.02	5.85
81a	54.99	403,861.48	5.61
81b	54.99	856,974.36	5.93
82	71.39	940,701.74	5.97

Tabla de resultados 1.



Navarrete 2006

**Figura 1**

Comparación de los resultados reales y los resultados de la estimación

No.	% Brucelosis	LOG 10	Y
	X	Y	a+bX
1a	0	5.47	5.6138
1b	0	5.46	5.6138
2	0	5.33	5.6138
3	0	6.03	5.6138
4a	0	5.76	5.6138
4b	0	5.46	5.6138
4c	0	5.99	5.6138
5a	0	6.57	5.6138
5b	0	5.37	5.6138
6a	0	5.41	5.6138
6b	0	5.27	5.6138
7a	0	5.39	5.6138
7b	0	5.46	5.6138
8	0	5.71	5.6138
9	0	5.48	5.6138
10	0.31	6.02	5.6160
11	0.32	5.35	5.6160
12a	0.4	5.10	5.6166
12b	0.4	5.37	5.6166
13	0.6	5.44	5.6180
14	0.61	5.68	5.6181
15a	0.71	4.92	5.6188
15b	0.71	5.75	5.6188
16	1.05	5.56	5.6212
17	1.07	5.36	5.6213
18	1.12	6.24	5.6216
19	1.2	5.43	5.6222
20	1.26	5.73	5.6226
21	1.28	5.52	5.6228
22	1.99	5.14	5.6277
23	2.02	5.42	5.6279
24	2.68	5.81	5.6326
25a	2.72	5.49	5.6328
25b	2.72	5.90	5.6328
26	2.73	6.05	5.6329
27	3.21	5.01	5.6363
28	3.8	5.48	5.6404
29	4.84	5.18	5.6477
30	4.95	5.51	5.6485
31	5	5.35	5.6488
32	5.6	5.63	5.6530
33	6.85	6.14	5.6618
34	8.51	5.62	5.6734
35	8.86	5.76	5.6758
36	9.24	5.58	5.6785
37	10.8	5.18	5.6894
38	12.36	6.36	5.7003
39	12.84	6.14	5.7037
40	14.81	5.64	5.7175
41a	14.81	6.14	5.7175

41b	14.81	6.14	5.7175
42	15.38	6.42	5.7215
43	15.55	5.90	5.7227
44	15.67	5.84	5.7235
45	16.15	5.86	5.7269
46	16.2	5.54	5.7272
47	17.6	5.56	5.7370
48	17.63	5.74	5.7372
49	18.25	5.39	5.7416
50	20.81	5.63	5.7595
51	21.74	6.50	5.7660
52	22.13	5.48	5.7687
53	23.63	5.59	5.7792
54	23.64	5.94	5.7793
55	24.84	6.08	5.7877
56	25.93	5.46	5.7953
57	26.85	5.88	5.8018
58	27.78	5.74	5.8083
59	29.38	6.44	5.8195
60	29.338	5.54	5.8192
61	30.89	5.54	5.8300
62	31.82	7.74	5.8365
63	32.22	5.48	5.8393
64	32.75	5.53	5.8431
65	33.33	5.69	5.8471
66	33.85	5.96	5.8508
67	34.32	5.96	5.8540
68	34.96	6.81	5.8585
69a	35.73	5.93	5.8639
69b	35.73	5.85	5.8639
70	35.98	5.53	5.8657
71	36.07	6.16	5.8663
72	36.36	5.70	5.8683
73	37.04	5.64	5.8731
74	37.8	5.56	5.8784
75	40.33	5.93	5.8961
76	47.15	5.47	5.9439
77	48.79	5.71	5.9553
78	48.98	5.76	5.9567
79	49.41	6.11	5.9597
80	50	5.85	5.9638
81a	54.99	5.61	5.9987
81b	54.99	5.93	5.9987
82	71.39	5.97	6.1135

Tabla de resultados 2.

## DISCUSIÓN

Dado que la causa principal del aumento en el conteo de células somáticas es la presencia de mastitis, ya sea clínica o subclínica; existen muchas investigaciones que estudian la relación entre el conteo de células somáticas y la prevalencia de mastitis. Sin embargo, en la mayoría de estos estudios se menciona que existen otros patógenos que también aumentan el número de células somáticas en leche (Hass y col., 2003) pero no se mencionan estos patógenos. Es por ello que en el presente estudio se relacionó a la brucelosis con el conteo de células somáticas con el fin de evidenciar que la seroprevalencia de brucelosis también influye en el conteo de células somáticas.

Por una parte el aumento en el conteo de células somáticas por infección de *Brucella*, puede deberse a que la brucelosis se asocia significativamente ( $P \leq 0.05$ ) a la prevalencia de mastitis subclínica como lo menciona Xolalpa (2000). Y por otra puede ser resultado de que la *B. abortus* como tal tiene un marcado tropismo por la glándula mamaria, como lo menciona Ruiz-Castañeda, en su escrito: Brucelosis (1989).

## CONCLUSIONES

Considerando los resultados obtenidos se puede concluir que aunque la presencia de brucelosis no es la única causa del aumento en el CCS, si se encontró una correlación positiva directa entre el aumento de la seroprevalencia de brucelosis y el aumento en la cuenta de células somáticas, la cual tiene una afectación sobre la cantidad de células somáticas en leche y que esto es un factor que influye directamente sobre los ingresos del ganadero al no alcanzar los niveles óptimos de conteo de células somáticas en leche y lograr así un mejor precio por su producto.

Con los resultados obtenidos del presente trabajo, se recomienda a los ganaderos y encargados de los establos:

1. Lotificar los hatos bajo un criterio de sanidad.
2. Realizar el ordeño de las vacas con serología positiva al final del ordeño o después de las vacas sanas.
3. Preferentemente eliminar a las vacas seropositivas. Esta última recomendación puede llevarse a cabo de forma gradual, eliminando los animales positivos al término de su producción.
4. Aplicar programas de higiene en los establos que se detecten animales positivos, evitar la movilización de ganado.

De igual forma se propone realizar medidas de prevención para brucelosis como son:

1. Vacunación.
2. Procurar que los animales de reemplazo no sean seropositivos.
3. Evitar la cría de animales seropositivos o de madres positivas, dado que pueden estar como portadores sanos de la enfermedad.
4. Realizar muestreos periódicos, para evitar mezclar animales positivos con negativos.
5. Brindar apoyos económicos a los ganaderos que eliminen vacas positivas hasta con un 30% del valor de un reemplazo.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. ALTON G.G. Techniques for the brucellosis laboratory. Inst. Nal. De la Reserche Agronomique. Francia. 1988.
2. AVILA TELLEZ. Producción intensiva de ganado lechero. Ed. Continental. México. 1990.
3. BASURTO V.K. Factores que contribuyen en la producción de leche. México Holstein. Vol. 22. No. 9. México. Septiembre. 1991.
4. BATH D. DICKINSON, F. TUCKER, A. Y R. APPLEMAN. Ganado lechero, principios, prácticas, problemas y beneficios. Ed. Interamericana. México. 1986.
5. BAYLEY T. El uso de los registros para la evaluación del hato. Décima conferencia del CIGAL. 2001.
6. BLASCO J. M. Profilaxis vacunal de la brucelosis en los rumiantes: las vacunas tradicionales y las nuevas vacunas. Memorias del III foro nacional de brucelosis. 1998. México. Facultad Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM.
7. BLOWEY, R. Y P. EDMONDSON. Control de la mastitis en granjas de vacuno de leche. Ed. Acribia. España. 1999.
8. Boletín de leche. Septiembre de 2003. México. [www.siea.sagarpa.gob.mx/ar\\_regbollech.html](http://www.siea.sagarpa.gob.mx/ar_regbollech.html).
9. CAMPOS LOPEZ H. La salud animal en México. Informe anual de la dirección general de salud animal. D.G.S.A. SARH. México. 1993.
10. CARTER G.R. Bacteriología y micología veterinaria. Ed. Manual moderno. México. 1985.
11. CARTER G.R. Y R.J. COLE. Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and microbiology. Ed Academic press. E.U.A. 1990.
12. CARTER G.R. y M.M. CHENGAPPA. Essential of veterinary bacteriology and micology. Ed. Lea & Febiger. Inglaterra. 1991.
13. CIPRIAN CARRASCO A. RODRÍGUEZ M. Y S. MENDOZA. Programa de acreditación de medico veterinario zootecnista. Material para la actualización técnica de brucelosis y tuberculosis bovina. Diagnóstico serológico de brucelosis y su interpretación. Ed. SARH. 1990.
14. Claridades agropecuarias. La situación del sector lechero en nuestro país. No 33. México. Mayo. 1996.
15. Claridades agropecuarias. Situación actual y perspectivas de la producción de la leche del ganado bovino. No. 77. México. Enero. 2000.
16. CONETB\_SAGAR. FEDMVZ. Manual de actualización técnica para la aprobación del Medico Veterinario en la tuberculosis bovina.
17. DEMETER K. Lactobacteriología. Ed. Acribia. España. 1969.

18. DÍAZ A.E., HERNÁNDEZ A.L., VALERO E.G. y Q.F. VELÁZQUEZ. Diagnóstico de brucelosis. INIFAP, SAGAR. México. 1998.
19. GARCÍA BOJALIL, C.M. Perspectivas de la ganadería tropical de México ante la globalización. Memorias del XXVII congreso nacional de buiatría. Asociación Nacional de Médicos Veterinarios especialistas en bovinos A.C. México 2003.
20. HAAS Y. VEERKAMP R. BARKEMA H. Y H. SCHUKKEN. Associations between pathogen-specific cases of clinical mastitis and somatic cell count patterns. Journal Dairy Science. Vol. 87. No. 1. 2004.
21. HINKS J. Cría del ganado lechero. Ed. El ateneo. Argentina. 1987.
22. HUITRON N. G. Determinación de la prevalencia de tuberculosis bovina y brucelosis en el municipio de Juanacatlán, Jalisco. Tesis de licenciatura, FESC, UNAM, México, 1998.
23. KRAFT H. Métodos de laboratorio clínico en medicina veterinaria de mamíferos domésticos. Ed. Acribia. España. 1998.
24. LEVIN R.I. Estadística para administradores. 2ª edición. Ed. Prentice-hall hispanoamericana. México. 1998.
25. LUNA J.E. y C.E. MEJÍA . La vacuna RB 51 Brucella abortus, en las actividades de la campaña nacional contra la brucelosis bovina.
26. MERK MANUAL de veterinaria, Brucelosis bovina. Ed. Centrum. España.1988.
27. MEYER M. E. Brucella. Tratado de microbiología veterinaria. Ed. Acribia. España. 1990.
28. MILLER R.H., PAAPE M.S y J.C. ACTON. Comparison of milk somatic cell counts by Coulter and Fossomatic counters. Journal of dairy science. Vol 69 No7 1986.
29. MORIYON U.I. e I. LOPEZ-GOÑI. Estructura genética y fisiología del género Brucella. Departamento de microbiología. Universidad de Navarra. España. 1999.
30. NICOLETTI P. Control de la Brucelosis con énfasis en la vacunación del ganado adulto en foro nacional sobre la brucelosis . México. 1978.
31. NOM-EM-011-ZOO-1994. Campaña nacional contra la brucelosis de los animales. México. 1995.
32. PEREZ P.L. Evaluación sexológica de la vacuna de brucella abortus cepa rugosa mutante por transposición en un hato de bovinos con brucelosis. Tesis de licenciatura. FESC-UNAM. México. 1996.
33. PHILPOT N. Importancia de la cuenta de células somáticas y factores que la afectan. Memorias del tercer congreso nacional de control de mastitis y calidad de la leche. México. 2001.

34. PHILPOT N. Y S. NICKERSON. Mastitis el contra ataque. Surge internacional-badson bros. Co. E.U.A. 1980.
35. REYES P.R. Evaluación de la sensibilidad y especificidad de varias pruebas diagnósticas usadas en brucelosis bovina. Tesis de licenciatura. FESC-UNAM. México. 1996.
36. ROMAN PONCE, H. Impacto del modelo GGAVATT en la transferencia de tecnología pecuaria. Memorias del XXV congreso nacional de buiatría. Asociación Nacional de Médicos Veterinarios especialistas en bovinos A.C.. México 2001.
37. RUIZ-CASTAÑEDA M. Brucelosis. Ed. Prensa medica. México. 1986.
38. SANTOS MORENO, A. Leche y sus derivados. Ed. Trillas. México. 1991.
39. SARAN A. Y M. CHAFFER. Mastitis y calidad de la leche. Ed. Intermédica. Argentina. 2000.
40. SCALAN Ch. Introducción a la bacteriología veterinaria. Ed. Acribia.España. 1988.
41. SCHURIG G.G. Vacunas contra brucelosis. Pasado, presente y futuro. Cepa RB51.Memorias 14| conferencia Internacional sobre ganado lechero. CIGAL. 1998.
42. Sistema Nacional de vigilancia epidemiológica. Brucelosis una enfermedad actual. SNVE, SSA. 1998.
43. TRUETA S.R. crónica de una muerte anunciada. Impactos del TLC en la ganadería bovina mexicana. Memorias del XXVII congreso nacional de buiatría. Asociación Nacional de Médicos Veterinarios especialistas en bovinos A.C.. México 2003.
44. VALERO G. Diagnostico Veterinario. Requisitos, proceso, interpretación, ventajas y desventajas de las técnicas de diagnóstico. Sociedad mexicana de patólogos veterinarios A.C. México. 1993.
45. WOLFER W. , CASTAÑEDA V.H., KLOPPERT B y M.Z. SHOECK. La mastitis bovina. Centro universitario de ciencias biológicas y agropecuarias. Universidad de Guadalajara.
46. XOLALPA V.M. Evaluación de los principales factores asociados a la falla reproductiva de las hembras bovinas del complejo agropecuario industrial de Tizayuca Hidalgo, México. Impacto de la brucelosis como factor fundamental. Tesis en opción al grado de doctor en ciencias.

<b>DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES</b> PUBLIC HEALTH SERVICE FOOD AND DRUG ADMINISTRATION <b>MILK LABORATORY EVALUATION FORM</b>	LABORATORY	
	LOCATION	LAB #
	DATE	X = DEVIATION O = NOT USED
		U = UNDETERMINED NA = NOT APPLICABLE

**DIRECT MICROSCOPIC SOMATIC CELL COUNT**  
 [Unless otherwise stated all tolerances are ±5%]

**SAMPLES**

**1. Laboratory Requirements (See CP, item 33 & 34)** .....

**APPARATUS**

**2. See Cultural Procedures, items 1-4** .....

- a. Functional fume hood, face velocity 100 cu. ft/min .....
- 1. Checked annually, records maintained, unit tagged .....

**3. Microscope Slides, Clean (see item 18), 2.54 x 7.62 cm** .....

- a. 11.28 mm diameter areas delineated .....
- b. Optionally, with center marks on sides of delineated area .....
- c. Optionally, 5.08 x 7.62 or 5.08 x 11.43 cm with 11.28 cm delineated areas .....

**4. Syringe** .....

- a. Metal (.....) .....
- 1. Suitable for rapid and convenient transfer of 0.01 mL of milk .....
- 2. Calibrated quarterly to deliver 0.0103±0.0005g (average of 10 consecutive weighings with milk) .....
- Avg. Wt. \_\_\_\_\_ Date \_\_\_\_\_ .....
- 3. Syringe etched with identification, and tagged with calibration date .....
- b. Micropipettor, with appropriate tips (.....) .....
- 1. Suitable for rapid and convenient transfer of 0.01 mL of milk .....
- 2. Calibrated quarterly to deliver 0.0103±0.0005g (average of 10 consecutive weighings with milk) .....
- Avg. Wt. \_\_\_\_\_ Date \_\_\_\_\_ .....
- 3. Syringe etched with identification and tagged with calibration date .....
- c. Records of syringe (metal or micro) calibration maintained .....

**5. Dissecting Needle, Bent Point** .....

- a. Suitable for spreading milk film .....

**6. Drying Device, Slide Drier or Incubator** .....

- a. Clean, dust-free, level surface .....
- b. Heat source regulated at 40-45C .....
- 1. Temperature monitored with thermometer .....

**7. Forceps or Slide Holder** .....

- a. Required for dipping and holding slides .....

**8. Staining Jars or Trays** .....

- a. With tight fitting covers .....
- b. Convenient size for holding solvents and stains .....

**9. Slide Storage** .....

- a. Clean, dust-free insect-proof boxes, cases or files .....

**10. Microscope Type:** .....

- a. Binocular with 1.8 mm oil immersion objective, rack and pinion sub-stage, condenser with iris diaphragm .....
- b. Oculars, 10X (12X or 12.5X), Huygenian or wide-field .....
- c. Optics provide a Single Strip Factor of 6070 or smaller .....
- 1. Each analyst measures field diameter and calculates SSF annually, round to three significant figures .....

2. Calculation of Single Strip Factor .....

- a. Using a stage micrometer (item 11), measure field diameter (D) of oil immersion objective lens in mm

D = \_\_\_\_\_ mm .....

- b. Compute SSF with formula: .....

SSF = 10,000/(11.28 x D) .....

SSF is \_\_\_\_\_ .....

d. Mechanical Stage .....

- 1. Suitable for examination of slides, smooth action, does not drift, allows proper tracking of smears .....

e. Microscope Lamp, provides adequate illumination .....

**11. Stage Micrometer Ruled with 0.1 and 0.01 mm Divisions** .....

**12. Hand Tally, accurate** .....

**MATERIALS**

**13. Immersion Oil** .....

- a. Refractive index 1.51-1.52 at 20C .....

**14. Levowitz-Weber Modification of the Newman-Lampert Stain** .....

- a. Slowly add 0.6 g certified methylene blue chloride to 52 mL of 95% ethyl alcohol and 44 mL of tetrachlorethane (reagent grade) in a 200 mL flask and swirl to dissolve .....
- b. When making stain, use gloves and prepare in fume hood (tetrachlorethane is TOXIC) .....
- c. Let stand for 12-24 hr at 4.4-7.2C .....
- d. Filter through Whatman No. 42 filter paper or equivalent .....
- e. Add 4 mL of glacial acetic acid .....
- f. Store in a clean, tightly closed container (traces of water or solvent may cause problems with this stain) .....
- g. Or, Commercially prepared (xylene or tetrachlorethane) .....
- Brand \_\_\_\_\_ Lot No \_\_\_\_\_ .....

**15. Canadian Formula Stain** .....

- a. Commercially prepared (xylene or tetrachlorethane) .....
- Brand \_\_\_\_\_ Lot No \_\_\_\_\_ .....

**16. Alternate Methylene Blue Stain** .....

- a. Prepare as in item 14 with reagents: .....
- 1. Combine: 0.5 g cert. methylene blue chloride .....
- 56 mL 95% ethyl alcohol .....
- 40 mL xylene .....
- 4 mL glacial acetic acid .....

**17. Pyronin Y-Methyl Green Stain for Goat Milk** .....

- a. Carnoy's fixative .....
- 1. Combine: 60 mL chloroform .....
- 20 mL glacial acetic acid .....
- 120 mL 100% ethyl alcohol .....
- b. Pyronin Y-methyl green stain .....
- 1. Combine: 1.0 g Pyronin Y .....
- 0.56 g methyl green .....
- 196 mL water .....
- 2. Filter through Whatman No. 1 paper before use .....
- 3. Stain is light sensitive; store in brown bottle .....

DIRECT MICROSCOPIC SOMATIC CELL COUNT
[Unless otherwise stated all tolerances are ±5%]

- 18. Slides, Cleaning
a. Physically clean
b. New slides may be cleaned by soaking in strong cleaning solution
c. Rinse thoroughly in flowing water 10-15 sec and MS water
d. Used slides may be soaked in hot detergent or wetting agent until all residues are removed, rinsed as above
e. Air or heat dry with minimal exposure to dust, insects, etc. and store dry
f. Or, store slides in alcohol and flame just before use

PROCEDURE

- 19. Slide Identification
a. Legibly and indelibly identify each sample area on margin of slide
20. Sample Agitation
a. Mix samples by shaking 25 times in 7 sec with 1 ft movement, sample removed within 3 minutes
b. Optional: Warm high fat samples to 40C for no longer than 10 minutes prior to testing (discard after testing)
21. Sample Measurement and Smear Preparation (Metal Syringe)
a. Before use and between successive samples, rinse syringe 2 - 3 times in clean, 25-35C water
b. Before transferring test portion to slide, dip tip of syringe not over 1 cm below surface (excluding foam) of milk and repeatedly rinse
c. Holding tip beneath surface, rinse syringe three times with milk, then fully depress and release plunger and withdraw test portion
d. With clean paper tissue or cloth, remove excess milk from exterior of tip (with syringe tip up, wipe downward away from tip)
e. Holding instrument vertical, place tip near center of area for smear, touch the slide with the tip and expel the test portion
1. With plunger still fully depressed, touch off once against a dry spot
2. Do not release plunger until after touching off and removing tip from slide
3. Spread milk with point of bent needle point (item 5), not hockey stick style
4. Wipe needle dry between samples on tissue or towel
f. After spreading test portion, dry smears at 40-45C within 5 min on level surface (see item 6)
g. To prevent smears from cracking and peeling from slide during staining, do not heat too rapidly
h. Protect smears and slides from damage until read
22. Metal Syringe Cleaning
a. Do not allow residues to dry on instrument
b. Immediately after use, carefully disassemble and clean syringe
c. Do not remove spring unless necessary
d. Use only soap-less detergents and/or fat solvents sparingly as needed

- e. Clean all residues from measuring tube circulating detergent with bulb on delivery end
f. Clean piston with dry paper tissue or cloth
23. Sample Measurement and Smear Preparation (Micropipettor)
a. Use clean tip for each sample
b. Depress plunger and dip tip not over 1 cm below surface (excluding foam) of well-mixed milk, fully release plunger slowly, remove tip from sample and dispel back to sample, re-insert tip and fully release plunger and withdraw test portion, touch off to dry area of sample container
c. If necessary, remove excess milk from exterior of tip by wiping away from the tip with clean paper tissue or cloth
d. Holding instrument vertical, place tip near center of area for smear, expel test portion and touch off once to dry spot
e. Spread milk with point of bent needle point (item 5), not hockey stick style
f. Wipe needle dry between samples on tissue or towel
g. After spreading test portion, dry smears at 40-45C within 5 min on level surface (see item 6)
h. To prevent smears from cracking and peeling from slide during staining, do not heat too rapidly
i. Protect smears and slides from damage until read
24. Staining Films
a. Levowitz-Weber and Methylene Blue Stains
1. Use ventilated hood for steps 2-4
2. Submerge or flood slides with fixed, dried smears in stain for 2 min (timer used)
3. Drain off excess stain by resting edge of slide on absorbent paper
4. Dry thoroughly (air dry or use cool forced air)
5. Dip dry stained slides in 3 changes of tap water at 35-45C
6. Drain and air dry slides before examining smears
b. Pyronin Y-Methyl Green Stain (New York Modification)
1. Slide is run through the following staining scheme
Carnoy's fixative----- 5 min
50% Ethanol----- 1 min
30% Ethanol----- 1 min
H2O----- 1 min
Stain----- 6 min
N-Butyl alcohol----- flush briefly
Xylene----- flush briefly
2. Cells stain blue or blue-green; RNA and background stain pink
25. Examination
a. Adjust microscope lamp to provide maximal optical resolution
b. Locate edge of smear to be read using low power
c. Place 1 drop immersion oil on smear
d. Carefully lower oil immersion lens
e. Focus and locate center of edge of area and begin counting cells
f. Count all cells in field wide strip across diameter of a single smear, focusing up and down as necessary

LABORATORY	LAB #	LOCATION	DATE
------------	-------	----------	------

**DIRECT MICROSCOPIC SOMATIC CELL COUNT**  
**[Unless otherwise stated all tolerances are ±5%]**

- g. Identifying and counting somatic cells ..... \_\_\_\_\_
  - 1. Cells possess a nucleus stained dark blue (bovine) or blue or blue-green (caprine) ..... \_\_\_\_\_
  - 2. Cells generally 8 microns or larger (bovine; caprine may be smaller); do not count cells less than 4 microns; fragments counted only if more than 50% of nuclear material visible ..... \_\_\_\_\_
  - 3. Cluster of cells counted as one unless nuclear unit(s) are clearly separated; focus up and down to ensure that there are no bridges connecting nuclear masses ..... \_\_\_\_\_
  - 4. Count cells touching only top or bottom half of strip ..... \_\_\_\_\_
  - 5. If in doubt, do not count ..... \_\_\_\_\_
- h. After examination of each smear record strip count ..... \_\_\_\_\_
- i. Conduct monthly comparative counting between analysts (refer to SPC item 19) ..... \_\_\_\_\_
- 26. Slide Storage** ..... \_\_\_\_\_
  - a. Remove oil by dipping in xylene (or equivalent), 15-20 sec ..... \_\_\_\_\_

- b. Air dry ..... \_\_\_\_\_
- c. Place in suitable storage (item 9) ..... \_\_\_\_\_

**REPORTS**

- 27. Records and Reporting** ..... \_\_\_\_\_
  - a. Maintain record of strip count for each smear examined ..... \_\_\_\_\_
  - b. Compute DMSCC/mL, multiply number of cells counted (strip count) by the SSF (item 10.c.2.b.) ..... \_\_\_\_\_
  - c. Report somatic cell counts as DMSCC/mL, record only first two left hand digits, round as necessary ..... \_\_\_\_\_
    - 1. If the third digit is 5 round the second number using the following rules ..... \_\_\_\_\_
      - a. When the second digit is odd round up (odd up, 235 to 240) ..... \_\_\_\_\_
      - b. When the second digit is even round down (even down, 225 to 220) ..... \_\_\_\_\_