



Universidad de León  
Facultad de Veterinaria  
Departamento de Producción Animal I

**EVALUACIÓN DEL MÉTODO FLUORO-OPTO-  
ELECTRÓNICO PARA LA DETERMINACIÓN DEL  
RECUENTO DE CÉLULAS SOMÁTICAS EN LA LECHE DE  
OVEJA**

**Juan Ramón MARTÍNEZ ÁLVAREZ**  
**Junio 1999**



Las investigaciones realizadas en esta Memoria de Tesis Doctoral han sido desarrolladas dentro del Proyecto Europeo N° FAIR1-CT95-0881, financiado por la Unión Europea y cofinanciado por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología a través del Proyecto Nacional de Ayuda Complementaria UE 96-0037.

El autor de esta Memoria ha sido beneficiario de una Beca Predoctoral con cargo al Proyecto Europeo N° FAIR1-CT95-0881.



## Agradecimientos

---

A **Carlos GONZALO ABASCAL**, por ser el verdadero responsable de que esta Tesis haya salido adelante y por haber estado siempre al lado de tus becarios, ya fuera para echarnos una mano o, simplemente, para tomar un café con nosotros y darnos ánimos –que no es poco-. Igualmente, quiero darte las gracias por no haber perdido nunca la esperanza, ni la profesionalidad, ni el buen humor, a pesar de los duros momentos que has pasado durante los últimos meses.

A **Fermín SAN PRIMITIVO TIRADOS**, por haber confiado en mí desde el principio.

A **Juan Antonio CARRIEDO GONZÁLEZ** y **L. Fernando DE LA FUENTE CRESPO**, por vuestro indispensable apoyo en el estudio estadístico.

A los **compañeros** (docentes, becarios, P.A.S. y contratados) que me habéis ayudado directamente, y con los que he compartido muchas horas: en el campo, en el laboratorio, en labores de traducción, en la sala de ordenadores o en las tareas administrativas. No tiene sentido escribir una lista interminable de nombres, pero quiero que sepáis que os estoy muy agradecido a todos. Gracias por vuestra ayuda y, sobre todo, por vuestra amistad.

Al resto de personas del **Departamento de Producción Animal I** de la Universidad de León, por haberme acogido tan bien a lo largo de estos tres años.

A los **ganaderos de ANCHE**, por vuestra colaboración.

A **mi familia**, por haberme aguantado con paciencia y resignación.

MUCHAS GRACIAS.



*A mis padres*  
*A Maruja*





ÍNDICE



---

<b>I. INTRODUCCIÓN, PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS</b> .....	1
<b>II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	7
<b>II.1. LAS CÉLULAS SOMÁTICAS DE LA LECHE COMO MECANISMO DEFENSIVO DE LA GLÁNDULA MAMARIA</b> .....	7
II.1.1. Clasificación de las células somáticas .....	8
II.1.1.1. Polimorfonucleares .....	8
II.1.1.2. Macrófagos mamarios .....	10
II.1.1.3. Linfocitos .....	11
II.1.1.4. Células epiteliales .....	14
II.1.1.5. Otros tipos celulares .....	16
II.1.2. Respuesta celular en la mastitis .....	17
II.1.3. Presencia de partículas citoplasmáticas .....	22
<b>II.2. MÉTODOS DIRECTOS DE RECUENTO CELULAR EN LA LECHE</b> .....	25
II.2.1. Método microscópico directo .....	25
II.2.1.1. Factores de variación .....	25
II.2.1.2. Determinación de células viables en la leche .....	30
II.2.2. Método fluoro–opto–electrónico .....	31
II.2.2.1. Principio .....	31
II.2.2.2. Equipos desarrollados .....	32
II.2.2.3. Factores de variación .....	34
II.2.3. Método de recuento electrónico de partículas .....	39
II.2.3.1. Principio .....	39
II.2.3.2. Equipos desarrollados .....	40
II.2.3.3. Factores de variación .....	41
II.2.4. Método del recuento de partículas por análisis de flujo continuo .....	43
II.2.5. Filtrado de ADN a través de membrana .....	44
<b>II.3. MÉTODOS INDIRECTOS DE RECUENTO CELULAR EN LA LECHE</b> .....	45
II.3.1. Test de Whiteside modificado .....	45
II.3.2. Test de California .....	46

---

II.3.3. Test de Brabante .....	49
II.3.4. Test de Wisconsin .....	50
II.3.5. Otras modificaciones al test de California .....	51
II.3.6. Test de la catalasa .....	51
II.4. COMPARACIÓN ENTRE MÉTODOS DE RECUENTO CELULAR .....	54
II.5. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE LOS TIPOS CELULARES .....	59
II.5.1. Método microscópico .....	59
II.5.2. Método de recuento electrónico de partículas .....	60
II.6. CONTROL DE CALIDAD .....	63
II.6.1. Tests comparativos .....	64
II.6.2. Patrones de referencia de recuento conocido .....	64
II.6.3. Ensayos entre laboratorios de análisis de leche de oveja y cabra .....	65
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>67</b>
III.1. EXPERIENCIA I .....	67
III.1.1. Diseño experimental .....	67
III.1.2. Metodología analítica .....	68
III.1.2.1. Recuento de células somáticas mediante el método microscópico directo .....	68
III.1.2.2. Recuento de células somáticas mediante el método Fluoro-opto-electrónico .....	77
III.1.3. Metodología estadística .....	79
III.1.3.1. Comparación de los métodos microscópico y fluoro-opto- electrónico de recuento de células somáticas en la leche de oveja	79
III.1.3.2. Factores extrínsecos de variación analítica del método fluoro- opto-electrónico en la leche de oveja: influencia de las condiciones de conservación, temperatura de almacenamiento, edad de la muestra y temperatura de análisis .....	80
III.2. EXPERIENCIA II .....	82
III.2.1. Diseño experimental .....	82
III.2.2. Metodología analítica .....	83
III.2.3. Metodología estadística .....	83

III.2.3.1. Comparación de los efectos de la refrigeración y la congelación en función del tipo de conservación utilizada y de la temperatura de análisis en la leche de oveja .....	83
III.2.3.2. Estudio de la conservación, edad de la leche, tipo de descongelación y temperatura de análisis sobre el recuento celular de muestras de leche individual de oveja mantenidas a temperatura de congelación .....	85
III.2.3.3. Precisión, correlación, componentes de varianza y repetibilidades entre los recuentos celulares obtenidos en las condiciones óptimas de análisis .....	86
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>89</b>
IV.1. EXPERIENCIA I .....	89
IV.1.1. Evaluación del método microscópico directo .....	89
IV.1.1.1. Comparación de medias .....	89
IV.1.1.2. Coeficientes de correlación .....	90
IV.1.1.3. Varianza residual y repetibilidades .....	90
IV.1.1.4. Partículas citoplasmáticas .....	91
IV.1.2. Comparación entre la microscopía directa y el método fluoro-opto-electrónico .....	93
IV.1.2.1. Comparación de medias .....	93
IV.1.2.2. Coeficientes de correlación .....	96
IV.1.2.3. Varianza residual y repetibilidades .....	99
IV.1.3. Estudio de la influencia de la conservación, almacenamiento, edad de la leche y temperatura de análisis sobre los recuentos celulares estimados por el método fluoro-opto-electrónico .....	102
IV.1.3.1. Conservación .....	104
IV.1.3.2. Temperatura de análisis .....	105
IV.1.3.3. Edad .....	106
IV.1.3.4. Almacenamiento .....	106
IV.1.3.5. Interacciones .....	108
IV.2. EXPERIENCIA II .....	120

---

IV.2.1. Comparación de los efectos de la refrigeración y de la congelación en función del tipo de conservación utilizada y de la temperatura de análisis .....	120
IV.2.1.1. Almacenamiento .....	120
IV.2.1.2. Interacciones .....	122
IV.2.2. Estudio de la conservación, edad de la leche, tipo de descongelación y temperatura de análisis sobre el recuento celular de muestras de leche de oveja mantenidas a temperatura de congelación .....	126
IV.2.2.1. Temperatura de análisis .....	126
IV.2.2.2. Conservación .....	126
IV.2.2.3. Tipo de descongelación .....	128
IV.2.2.4. Edad .....	129
IV.2.2.5. Interacciones .....	129
IV.2.3. Exactitud, correlación, componentes de varianza y repetibilidades entre los recuentos obtenidos en las condiciones óptimas de análisis .....	134
<b>V. CONCLUSIONES</b> .....	141
<b>VI. RESUMEN</b> .....	143
<b>VII. SUMMARY</b> .....	147
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	151
<b>IX. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS</b> .....	159
VIII.1. ÍNDICE DE TABLAS .....	159
VIII.2. ÍNDICE DE FIGURAS .....	162
<b>X. ÍNDICE DE ABREVIATURAS</b> .....	165
<b>XI. ANEXO: Recuentos de células somáticas, en términos de logaritmo decimal, obtenidos por microscopía directa (3 tinciones) y por el método fluoro-opto-electrónico a las 24 horas posrecogida, correspondientes a las 80 muestras, por duplicado, de la Experiencia I.....</b>	167

## I. INTRODUCCIÓN, PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS





El recuento de células somáticas (RCS) de la leche viene siendo utilizado desde hace décadas como un método indirecto de diagnóstico del estado sanitario de la mama y también como estimulador e incentivador de los programas de control de mastitis en el ganado vacuno, y comienza ahora a serlo en el ganado ovino lechero (GONZALO *et al.*, 1994; MARCO, 1994; TARDÁGUILA, 1999).

A este respecto, los principales métodos de RCS de la leche, como son la microscopía directa (MD), el método de recuento electrónico de partículas (REP) y el método fluoro-opto-electrónico (FOE), han sido estandarizados en la leche de vaca (FIL-IDF, 1995; SCHMIDT-MADSEN, 1975), pero existe muy poca información sobre su aplicación específica a la leche de oveja (GONZALO *et al.*, 1993) y cabra (DULIN *et al.*, 1982b; POUTREL y LERONDELLE, 1983), que, como es bien conocido, tienen una composición muy diferente a la de la vaca. Adicionalmente, la presencia de material extracelular membranoso, restos nucleares y fragmentos celulares descritos en la leche de oveja (LEE y OUTERIDGE, 1981; PERIS *et al.*, 1993; SCHALM *et al.*, 1971) y en la de cabra (DULIN *et al.*, 1982b; PETTERSEN, 1981; SIERRA *et al.*, 1996a; SIERRA *et al.*, 1996b) impide una extrapolación de la validez de métodos de RCS entre especies.

En efecto, es bien conocido cómo la presencia de fragmentos celulares y partículas citoplasmáticas (PC), constantemente observados en la leche de cabra, condiciona decisivamente el método de RCS a utilizar en esta especie (DULIN *et al.*, 1982b; POUTREL y LERONDELLE, 1983). Estas PC no leucocíticas son el resultado de la secreción láctea marcadamente apocrina de la cabra, caracterizada por el desprendimiento apical de las células secretoras de grandes fragmentos de citoplasma, ricos en material granular ribosómico ARN-positivo, de un tamaño similar al de los leucocitos (5-30  $\mu\text{m}$ ), pero carentes de ADN y carentes, igualmente, de significación patológica. En consecuencia, en esta especie únicamente deberán utilizarse métodos específicos de ADN, que efectúen el recuento específico de los leucocitos y no de las

---

PC.

El método de referencia recomendado por la Federación Internacional de Lechería (FIL-IDF, 1995) para el RCS es el método microscópico directo (MD) mediante la tinción azul de metileno (AM). Esta técnica es rápida y fácil de realizar, pero presenta el inconveniente de su falta de especificidad desde el punto de vista tintorial, al no permitir la distinción entre las células propiamente dichas y las PC. Esta falta de especificidad tintorial hace que resulte conveniente llevar a cabo ensayos de MD utilizando tinciones que proporcionen una mayor resolución microscópica, como puede ser la tinción May-Grünwald-Giemsa (MGG) (GONZALO y GAUDIOSO, 1983), u otras más específicas que diferencien el núcleo del citoplasma, como es el caso de la tinción pironina Y-verde de metilo (PVM) (PAAPE *et al.*, 1963).

No obstante lo anterior, la enorme cantidad de muestras que diariamente llegan a los laboratorios de control lechero hace inviable, en la práctica, el uso de la MD para análisis rutinarios; por una parte, porque se requiere personal experimentado en el RCS y, por otro lado, porque el proceso es muy lento, ya que se precisa invertir varias horas desde que se realiza la extensión de la muestra de leche hasta que se concluye su RCS. Además, cabe añadir que el RCS mediante la MD está sometido a numerosas fuentes de error (HEESCHEN, 1975), derivadas de la posibilidad de una inadecuada distribución de las células en la extensión, subjetividad a la hora de decidir si un objeto es o no una célula, error en el factor de microscopio, falta de representatividad del número de campos contados, etc. Todas estas razones hacen aconsejable e, incluso, imprescindible el empleo rutinario de analizadores rápidos y automatizados de RCS, relegando la MD como técnica de contraste y verificación de los mismos.

En los últimos años se han venido utilizando diversos métodos automatizados, entre ellos fundamentalmente dos: el método REP, profusamente citado en la bibliografía (DULIN *et al.*, 1982b; MILLER *et al.*, 1986; POULTREL y LERONDELLE, 1983) y el método FOE, basado en la fijación del ADN celular a un colorante fluorescente (GRAPPIN y JEUNET, 1974). No obstante, tales métodos analíticos para el RCS han sido desarrollados y estandarizados en leche de vaca (FIL-IDF, 1995), disponiéndose de muy escasa información sobre su evaluación y contraste en leche de oveja y cabra. En esta última especie, algunos estudios (DULIN *et al.*, 1982b; PETERSEN, 1981; POULTREL y LERONDELLE, 1983; SHELDRAKE *et al.*, 1981) han mostrado grandes discrepancias entre los RCS obtenidos por diferentes métodos. En

efecto, aquéllos basados en el REP y los métodos MD que emplean tinciones no específicas (por ejemplo: el AM) no diferencian entre PC y leucocitos y dan lugar a RCS más variables y significativamente más elevados que los obtenidos con métodos que valoran específicamente el ADN, como, por ejemplo, el FOE o el método MD con la tinción PVM. Así, solamente estos últimos métodos han proporcionado estimaciones fiables del RCS para leche de glándula (DULIN *et al.*, 1983a; DULIN *et al.*, 1983b; DULIN *et al.*, 1982b) y de tanque (DROKE *et al.*, 1993) en esta especie. Entre todos ellos parece, por tanto, que el uso del FOE como método automatizado, rápido y específico del ADN celular garantiza la fiabilidad del RCS al evitar, de forma sistemática, el recuento de PC de la leche de pequeños rumiantes.

Sin embargo, y aun siendo de gran importancia, la discusión no se debe centrar exclusivamente en el método idóneo de RCS, sino que, demostrada la validez de un método, es preciso abordar el estudio de los factores, tanto de muestreo como analíticos, de variación del RCS del mismo. En este sentido, y por lo que respecta a la leche de oveja, existen pocos trabajos que hayan fijado las condiciones óptimas para el uso del método FOE (GONZALO *et al.*, 1993). Estos autores enfatizan ya la necesidad de estandarizar la metodología en leche de esta especie, debido a la influencia de determinados factores, como son la edad de la muestra y la temperatura de almacenamiento (GONZALO *et al.*, 1993), o la presencia de restos celulares (LEE y OUTERIDGE, 1981; PERIS *et al.*, 1993) que pueden afectar al RCS de forma significativa. Por otra parte, otros investigadores también han encontrado efectos significativos de otros factores, como, por ejemplo, el conservante usado (BARCINA *et al.*, 1987; BERTRAND, 1996; LEE *et al.*, 1986; SCHMIDT-MADSEN, 1979), el tipo de tinción utilizada (PAAPE *et al.*, 1963) y las temperaturas de análisis (MILLER *et al.*, 1986) y de conservación (BARKEMA *et al.*, 1997; LEE *et al.*, 1986) sobre el RCS en la leche de vaca.

Estos antecedentes resaltan el interés de contrastar el método automatizado de recuento FOE frente al método MD de referencia en la leche de oveja, utilizando, además del AM, recomendado por la FIL-IDF (1995), otras tinciones más específicas, como el MGG y la PVM. Al mismo tiempo, resultaría de gran interés definir perfectamente las normas y condiciones óptimas, tanto de muestreo como de utilización, del método FOE bajo diferentes condiciones analíticas, con el fin de fijar la metodología más precisa para el análisis celular de una muestra dada, particularmente en lo que hace referencia a los conservantes más recomendables a

---

utilizar, temperaturas de conservación, incluida la congelación, temperatura de análisis de la leche y efecto de la edad de las muestras de leche.

Esta estandarización del método FOE en la leche de oveja resulta indispensable no sólo como condición primordial de cara a garantizar la reproductibilidad de resultados entre laboratorios y el control de calidad de los mismos en materia de RCS, sino también con el fin de conocer las normas de muestreo y condiciones de conservación y analíticas óptimas para el RCS en esta especie.

A la luz de la Normativa Comunitaria sobre Calidad de Leche (Directivas 92/46/CEE y 94/71/CEE), la importancia de estos aspectos es máxima en el momento actual, dados los alarmantes RCS de la leche de los rebaños en los países del Sur de Europa y, en consecuencia, el interés por fundamentar las estrategias más adecuadas de control del RCS en la leche de pequeños rumiantes sobre bases analíticas precisas, fiables y reproducibles. Tales estrategias de control, tendentes a garantizar la calidad higio-sanitaria de la leche, constituyen actualmente el tema de estudio del Proyecto Europeo de Investigación FAIR1-CT95-0881 (*Estrategias de control en granja del recuento de células somáticas de la leche de oveja y cabra*), en el que participan un total de 16 entidades europeas, entre grupos de investigación y laboratorios implicados. El Departamento de Producción Animal I de la Universidad de León es uno de los equipos de investigación mencionados, y la presente Memoria de Tesis Doctoral se enmarca dentro del Objetivo 1 de dicho Proyecto, concerniente a la estandarización de los métodos de medida del RCS en la leche de pequeños rumiantes, básicamente a través del estudio de los factores intrínsecos y extrínsecos de variación analítica del RCS y de la puesta en marcha de un sistema de control de calidad entre los laboratorios de análisis lecheros de los países participantes en el Proyecto (España, Italia y Francia).

En consecuencia, a la hora de realizar esta Memoria de Tesis Doctoral nos hemos propuesto los siguientes objetivos, tendentes a la estandarización en la leche de oveja del método FOE, recomendado por la FIL-IDF (1995) en la leche de vaca:

1. Evaluación del método FOE de RCS mediante el método MD, usando tinciones de diferente especificidad, en leche de oveja.

2. Estudio de los factores de variación más importantes del RCS estimado por el método FOE en muestras de leche de oveja frescas y conservadas, almacenadas a una temperatura mayor de 0° C.
3. Evaluación de la congelación frente a la refrigeración de la leche de oveja en el método FOE de estimación del RCS.
4. Estudio de los factores de variación del RCS estimado por el método FOE en muestras de leche de oveja congeladas a -20° C.

Con el fin de cumplir los objetivos marcados, se han diseñado dos experiencias distintas, con la primera de las cuales se ha pretendido cubrir los dos primeros objetivos y, con la segunda, los dos últimos:

**Experiencia I.** Comparación de los métodos MD y FOE de RCS y estudio de la influencia de las condiciones de conservación, temperatura de almacenamiento, edad de la muestra y temperatura de análisis, sobre el método FOE en la leche de oveja.

**Experiencia II.** Estudio del efecto de la congelación sobre el RCS estimado por el método FOE y de la influencia de la conservación, edad de la muestra, tipo de descongelación y temperatura de análisis, sobre el RCS de la leche de oveja almacenada a temperatura de congelación (-20° C).



## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA





## II.1. LAS CÉLULAS SOMÁTICAS DE LA LECHE COMO MECANISMO DEFENSIVO DE LA GLÁNDULA MAMARIA

---

La inflamación de la glándula mamaria (mastitis) no es diferente de la de otros tejidos corporales. Los signos cardinales de la inflamación (rubor, tumor, calor y dolor) y la pérdida de funcionalidad no siempre desarrollan una intensidad suficientemente grande para reconocer la presencia de un proceso mastítico. La aparición del proceso inflamatorio en ausencia de signos clínicos se denomina *mastitis subclínica* (SCHALM *et al.*, 1971), de frecuencia muy superior a la de la mastitis clínica (MARCO *et al.*, 1992).

La defensa de la glándula mamaria contra los agentes patógenos causantes de mamitis está mediada por varios factores protectores anatómicos, celulares y solubles. Una vez que las bacterias han logrado atravesar satisfactoriamente el canal del pezón, la eficiencia de estos mecanismos defensivos determinará la resistencia de la glándula frente a una nueva infección. Como han señalado SORDILLO *et al.* (1997) para la vaca, dichos mecanismos pueden dividirse en dos categorías distintas: la inmunidad innata o inespecífica y la inmunidad adquirida o específica

La inmunidad innata constituye el tipo de defensa predominante durante los estadios tempranos de la infección. La respuesta inespecífica se encontraría ya presente en el foco de infección, o bien se activaría rápidamente por numerosos estímulos, aunque no se vería incrementada ante exposiciones repetidas a la misma agresión. En esta respuesta inespecífica se encontrarían implicados la barrera física de la punta del pezón, los macrófagos, los polimorfonucleares (PMN), las células asesinas naturales (*natural killer*) y ciertos factores solubles.

Por otra parte, el sistema de inmunidad adquirida reconoce específicamente constituyentes determinados de un patógeno, facilitando así su eliminación selectiva.

## II.1. Las células somáticas de la leche

---

En ese reconocimiento de los factores patogénicos están involucrados los anticuerpos, los macrófagos y varias poblaciones linfoides. Debido a la *memoria* de algunos linfocitos, las respuestas inmunes específicas pueden potenciarse mediante la exposición repetida a un mismo patógeno. En la glándula mamaria, tanto los factores protectores innatos como los adquiridos se hallan coordinados para proporcionar una protección óptima frente a la enfermedad.

Tal y como señalaron SORDILLO *et al.* (1997), la actividad de los leucocitos residentes y de los recién reclutados durante los estadios tempranos de la patogénesis juega un papel central en el establecimiento de la infección intramamaria. Igualmente, en el transcurso de la infección, son los leucocitos PMN quienes adquieren una clara preponderancia numérica con relación a los otros tipos celulares, tanto en la vaca (JASPER, 1980) como en la oveja (GONZALO y GAUDIOSO, 1985). En consecuencia, en la glándula sana en lactación, los RCS son a menudo menores de  $10^5$ /ml de leche, mientras que, durante la infección bacteriana, los recuentos totales pueden incrementarse hasta concentraciones mayores de  $10^6$ /ml en muy pocas horas.

### II.1.1. CLASIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS SOMÁTICAS

Las células somáticas que aparecen en la leche son de varios tipos, según LEE y OUTERIDGE (1981) y SORDILLO *et al.* (1997): PMN, macrófagos, linfocitos y, en un porcentaje menor, células epiteliales.

#### II.1.1.1. POLIMORFONUCLEARES

Los PMN presentes en la leche derivan de la sangre y mantienen casi todas sus características. Son redondos, elípticos o de contorno irregular. El núcleo se tiñe de color púrpura en distinto grado y presenta la característica de ser lobulado, con finos filamentos conectando los lóbulos en ciertas células. El citoplasma contiene cantidades variables de pequeños gránulos rosas, que le confieren un tono característico. Una proporción variable de células tiene en el citoplasma una o más vacuolas de grasa, que pueden desplazar a los gránulos específicos hacia ciertas zonas más estrechas del citoplasma e, incluso, deformar en ocasiones al núcleo. Es posible

observar PMN vacuolados en varios estadios distintos de degeneración dentro de la misma extensión (SCHALM *et al.*, 1971).

Los PMN constituyen el tipo celular predominante encontrado en las secreciones y tejidos mamarios durante la inflamación temprana y pueden representar más del 90% del total de leucocitos de la mama (GONZALO y GAUDIOSO, 1985; SORDILLO *et al.*, 1989), aunque DULIN *et al.* (1983a), LEE y OUTERIDGE (1981) y SORDILLO *et al.* (1997) señalaron que se encuentran en un número bajo en la glándula sana no infectada.

Como han citado estos últimos autores, estas células inespecíficas se trasladan desde la sangre a la glándula mamaria en respuesta a una variedad de mediadores inflamatorios, tales como citoquinas, complemento y prostaglandinas. Una vez en el lugar de infección, los PMN fagocitan y matan a los patógenos bacterianos, ejerciendo su acción a través de un proceso respiratorio que origina radicales hidroxilo y oxígeno, los cuales son componentes clave de la vía oxidativa de muerte bacteriana. Las bacterias mueren por la acción del peróxido de hidrógeno, de los iones superóxido y del hipoclorito. También existe otro mecanismo de muerte celular dependiente del oxígeno, en el que se utiliza no sólo este elemento, sino, además, haluros y la enzima mieloperoxidasa. Esta enzima cataliza la reacción entre el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> del proceso oxidativo, antes mencionado, y los haluros (Cl<sup>-</sup>, I<sup>-</sup> o Br<sup>-</sup>), formándose los denominados hipohaluros, altamente tóxicos. La acción de la mieloperoxidasa, localizada en los gránulos azurofílicos de los PMN, alcanza a la bacteria cuando el contenido del gránulo es liberado al fagosoma (AMORENA *et al.*, 1992). Durante el proceso fagocítico, las bacterias también pueden verse expuestas a sustancias de la vía no-oxidativa, como son la peroxidasa, la lisozima, varias enzimas hidrolíticas y la lactoferrina (SORDILLO *et al.*, 1997). LEE y OUTERIDGE (1981) señalaron que su papel fagocítico no se encuentra limitado a los microorganismos, sino que, al menos en el calostro y en la leche, estas células son capaces de englobar restos celulares y otros componentes lácteos (gotas de grasa, micelas de caseína, etc.) de modo similar a como lo hacen los macrófagos, aunque en menor grado. En definitiva, como han señalado SCHALM *et al.* (1971), el PMN es un agente importante que influye en la magnitud y duración de la inflamación.

A pesar de todo, debido a que la concentración de oxígeno en la leche es muy baja, la eficiencia de los mecanismos oxidativos celulares es muy pequeña y, por lo tanto, también lo es la actividad bactericida de los PMN (AMORENA *et al.*, 1992). Por

## II.1. Las células somáticas de la leche

---

otro lado, esa fagocitosis de las micelas de caseína (RUSSEL *et al.*, 1976) y de los glóbulos de grasa (PAAPE *et al.*, 1975) podría inhibir la actividad bactericida de los PMN como consecuencia de la dispersión de los elementos bactericidas lejos de los fagosomas que contienen las bacterias, suposición sustentada igualmente en los hallazgos de WILLIAMS *et al.* (1985). Esta pérdida de actividad fagocitaria de los PMN de la leche, comparativamente a los PMN sanguíneos, también ha sido atribuida al bajo contenido en glucógeno de ellos, ya que para el metabolismo oxidativo se requiere energía (AMORENA *et al.*, 1992).

Además de esa capacidad fagocítica, los PMN son una fuente de pequeños péptidos antibacterianos, las *defensinas*, capaces de eliminar a cierto número de los patógenos causantes de mastitis (SELSTED *et al.*, 1993).

### II.1.1.2. MACRÓFAGOS MAMARIOS

Las células mononucleares vacuoladas, tradicionalmente consideradas como células epiteliales, han sido clasificadas a comienzos de los años 80 como macrófagos en la leche de vaca (DULIN *et al.*, 1982a; LEE *et al.*, 1980; NELSON *et al.*, 1967; NICKERSON y HEALD, 1982), de cabra (DULIN *et al.*, 1983b; DULIN *et al.*, 1982b) y de oveja (DULIN *et al.*, 1983a; LEE y OUTERIDGE, 1981; OUTERIDGE y LEE, 1981).

Son las células más abundantes de la leche y los tejidos de la glándula mamaria sana, tanto en lactación como involucionada (JENSEN y EBERHART, 1981; LEE *et al.*, 1980; SORDILLO y NICKERSON, 1988). Su tamaño y apariencia varían con el estado de lactación y con el entorno en el que estén inmersos. Básicamente contienen un gran núcleo de formas diferentes con cromatina difusa. El citoplasma es abundante y posee mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico rugoso, ribosomas libres, lisosomas y fagosomas (LEE y OUTERIDGE, 1981). Al igual que los PMN, son activas células fagocíticas de la mama, capaces de ingerir bacterias, restos celulares y componentes de la leche (SORDILLO y NICKERSON, 1988 ). Como indicaron LEE y OUTERIDGE (1981), su capacidad para fagocitar dichos restos celulares y gotas de grasa es mucho mayor que la de los PMN. Los rasgos anteriormente citados fueron evidentes en macrófagos aislados del calostro y de la leche de oveja, así como de la secreción propia de la glándula mamaria en los estadios tempranos de su involución, donde, debido a la fagocitosis de muchas gotas lipídicas,

su citoplasma se presentaba más voluminoso. La inmensa mayoría de estas inclusiones eran glóbulos grasos típicos de la leche con su característica membrana compuesta, rodeados por la unidad de membrana de la vacuola fagocítica, aunque algunas gotas lipídicas no se encontraban rodeadas por ella. Los macrófagos de glándulas en estado avanzado de involución no poseen habitualmente gotas grasas, lo que parecería indicar que la mayor parte de la grasa láctea ya habría sido eliminada en ese momento, mientras que sí son capaces de fagocitar partículas de látex introducidas intencionadamente. Estos últimos autores también han indicado que su gran capacidad fagocítica hace suponer que su función principal es proteger a la mama en procesos inflamatorios crónicos (SCHALM *et al.*, 1971) y también al intestino del neonato lactante de agresiones bacterianas.

Como han indicado SORDILLO *et al.* (1997), además de su papel en la defensa inespecífica temprana, los macrófagos también tienen una función clave en la preparación y presentación antigénica. Los antígenos de las bacterias fagocitadas se preparan dentro de los macrófagos y aparecen en la membrana asociados con los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II. Estos antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II son moléculas de membrana polimórficas requeridas por los linfocitos para reconocer antígenos extraños. Por último, cabe señalar que el poder fagocítico de los macrófagos se puede incrementar sustancialmente con la presencia de anticuerpos opsonizantes y que, debido a la ingestión indiscriminada de grasa, caseína y otros compuestos lácteos en la glándula mamaria, la capacidad fagocítica de ellos y de los PMN es menos efectiva que en la sangre, como habíamos sugerido anteriormente. Al igual que ocurre con los PMN, su actividad fagocitaria y bactericida se encuentra especialmente deprimida durante el período que rodea al parto.

### II.1.1.3. LINFOCITOS

La aparición de una inmunidad específica efectiva implica, por un lado, a las células que presentan los antígenos y, por otro, a los linfocitos, como únicas células del sistema inmune que reconocen antígenos a través de receptores de membrana específicos para los agentes patógenos invasores (SORDILLO *et al.*, 1997). Son las más pequeñas de las células presentes en la leche de oveja. Tienen un escaso citoplasma y

contienen un núcleo redondeado, frecuentemente con una dentación en uno de los lados (LEE y OUTERIDGE, 1981). La presencia de linfocitos sería el resultado de una infiltración fija de dichas células desde los espacios intersticiales hasta la leche, a través del epitelio mamario, de modo parecido a la forma en que ellas acceden a otras cavidades del cuerpo, como podría ser la cavidad peritoneal. Al contrario de lo que sucede con los PMN, algunos linfocitos pueden recircular con la linfa (SCHALM *et al.*, 1971).

Existen dos poblaciones distintas de linfocitos, que difieren en la función y en sus productos proteicos, y que han sido descritas por SORDILLO *et al.* (1997): linfocitos T y linfocitos B. A su vez, los linfocitos T pueden subdividirse en linfocitos T  $\alpha\beta$ , que incluyen a los CD4+ (T-de ayuda) y a los CD8+ (T-citotóxicos o T-supresores), y en linfocitos T  $\gamma\delta$ . Dependiendo del estado de lactación y de la localización del tejido, los porcentajes de estas células pueden variar significativamente. Muy sucintamente pasamos a describir las funciones de cada tipo celular:

- **Linfocitos T-de ayuda.** Secretan citoquinas cuando reconocen la unión antígeno-complejo mayor de histocompatibilidad sobre los linfocitos B y macrófagos. Gracias a esta capacidad para secretar ciertas citoquinas, las células CD4+ desempeñan, como veremos más adelante, un papel importante en la activación de linfocitos B, linfocitos T, macrófagos y otras células que participan en la respuesta inmune. Estudios previos (PARK *et al.*, 1992; SHAFER-WEAVER y SORDILLO, 1996) han demostrado que los linfocitos CD8+ son el fenotipo predominante tanto en los tejidos como en las secreciones de la mama sana, con una relación CD4+:CD8+ menor que 1, mientras que en la sangre periférica la relación CD4+:CD8+ es mayor que la unidad.
- **Linfocitos CD8+.** Se sabe con seguridad que los linfocitos CD8+ ejercen una acción citotóxica, o bien una acción supresora. Los linfocitos T-citotóxicos reconocen y eliminan a las células propias alteradas mediante la presentación del antígeno junto con las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I. Por lo tanto, las células citotóxicas pueden actuar eliminando células secretoras viejas o dañadas, cuya presencia podría dar lugar a un incremento de la susceptibilidad de la mama a las infecciones. Por otro lado, se piensa que los linfocitos T-supresores controlarían o

modularían la respuesta inmune. Así, se ha demostrado que los CD8<sup>+</sup> pueden afectar de modo importante a la inmunidad del hospedador durante las infecciones bacterianas, alterando o suprimiendo las respuestas proliferativas de los CD4<sup>+</sup>. Investigaciones llevadas a cabo recientemente con linfocitos CD8<sup>+</sup> mamarios de vaca sugieren que el papel inmunorregulador de estas células dependería del estado de lactación: los CD8<sup>+</sup> que siguen inmediatamente al parto son del tipo supresor, pero los hallados desde la mitad hasta el final de la lactación presentan más bien una naturaleza citotóxica.

- **Linfocitos T  $\gamma\delta$ .** Las funciones de los linfocitos T  $\gamma\delta$  se asocian, en un principio, con la protección de superficies epiteliales. Hay indicadores de que los linfocitos T  $\gamma\delta$  tendrían un poder citotóxico, pudiendo ser capaces de destruir células epiteliales alteradas. Dichas células también podrían jugar cierto papel en las enfermedades infecciosas y, por tanto, proporcionar una línea importante de defensa contra las infecciones bacterianas. Tanto en humanos como en rumiantes se originan mayores niveles de linfocitos T  $\gamma\delta$  en el parénquima y secreciones mamarias que en la sangre.

- **Células asesinas naturales.** Son linfocitos grandes y granulados no inmunes, con poder citotóxico en ausencia de la restricción del complejo mayor de histocompatibilidad. No obstante, contienen receptores Fc, que las capacitan para participar en una citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos. Una vez que estas células se unen, por medio de los receptores Fc, a una célula diana, ligada a su vez a anticuerpos, tiene lugar la destrucción de dichas células diana. Las células asesinas naturales pueden, de igual modo, secretar varias moléculas tóxicas, como el *factor de necrosis tumoral*, que estaría capacitado para iniciar la apoptosis en células alteradas. Su habilidad para intervenir en la -ya mencionada- citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, hace pensar que podrían jugar un papel en las infecciones bacterianas.

- **Linfocitos B.** La función primaria de los linfocitos B es producir anticuerpos contra los agentes patógenos invasores. Al contrario que los macrófagos y PMN, los linfocitos B utilizan sus receptores de superficie para reconocer específicamente a esos patógenos. Pueden procesar y presentar los antígenos a los linfocitos T-de ayuda en el contexto de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II. Cuando los antígenos

procesados son presentados a los linfocitos T-de ayuda, éstos secretan interleucina-2, que induce sucesivamente la proliferación y diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas, que producen anticuerpos, y a las que nos vamos a referir a continuación. Contrariamente a los linfocitos T, los porcentajes de los B permanecen constantes en los distintos estados de lactación.

- **Células plasmáticas.** Se caracterizan por presentar un núcleo redondo y esférico, cuya cromatina está condensada y colocada en gránulos densamente teñidos que le confieren una *apariencia de reloj*. Su citoplasma es abundante y posee un aparato de Golgi grande. La característica más significativa de estas células es la presencia de numerosas cisternas de retículo endoplásmico rugoso colapsadas o dilatadas. Igualmente, aparecen algunas mitocondrias (LEE y OUTERIDGE, 1981). GOLDBLUM *et al.* (1975) observaron células productoras de inmunoglobulinas A, presumiblemente células plasmáticas, en calostro humano; sin embargo, es más probable que en calostro ovino produzcan IgG o IgM, pues las células que secretan IgA aparecen únicamente en la glándula mamaria de la oveja después de una estimulación antigénica local (LEE y LASCELLES, 1970).

LEE y OUTERIDGE (1981) han reseñado que, a la vista de la persistencia de los linfocitos en la secreción mamaria durante toda la lactación y de la importancia que tienen en el desarrollo de la inmunidad, se ha puesto interés en su papel en el calostro humano (PARMELY y BEER, 1977) como protector del neonato. Asimismo, aquellos autores indicaron que ciertos estudios han mostrado la presencia de linfocitos T y B en dicho calostro y en la leche normal bovina (CONCHA *et al.*, 1978). Algunos de los linfocitos calostrales humanos son responsables de fenómenos de fitohemoaglutinación y estimulación mitogénica, de igual modo que los linfocitos de la leche de vaca y perra (LEE y OUTERIDGE, 1981).

### II.1.1.4. CÉLULAS EPITELIALES

Se ha señalado (SCHALM *et al.*, 1971) la presencia de varios tipos de células epiteliales en la leche, pero éstas podrían agruparse en dos categorías generales según sus características citoplasmáticas: no-vacuoladas y vacuoladas:



- **Células epiteliales no-vacuoladas.** Varían en tamaño y generalmente son más pequeñas que las vacuoladas. El núcleo es grande, esférico o elíptico y está bien definido. El citoplasma es ligera o moderadamente basófilo. No es granular y se encuentra desprovisto de glóbulos grasos, aunque en ocasiones puede aparecer con aspecto esponjoso. De forma muy ocasional pueden verse dos o más células no-vacuoladas en grupos, apareciendo entonces sus citoplasmas adyacentes, lo que indica una descamación en masa.
- **Células epiteliales vacuoladas.** Pueden presentar desde un tamaño medio hasta aparecer como grandes células en las extensiones de leche. Su núcleo también es grande y bien definido, esférico, elíptico o de contorno irregular. El citoplasma, en cantidad variable, contiene diverso número de glóbulos grasos de distintos tamaños y se tiñe de color azul más o menos intenso (basófilo) o de rosa (acidófilo), pudiendo contener gránulos rojizos o purpúreos. Las células más pequeñas poseen habitualmente un citoplasma azulado, un núcleo proporcionado y bien definido y cierto número de vacuolas grasas. Las células mayores pueden presentar un citoplasma de color ligeramente azul o rosa, muchos glóbulos grasos y un núcleo desproporcionadamente pequeño. Las células epiteliales degeneradas pueden tener vacuolas en el núcleo o, más comúnmente, mostrar la desintegración de éste en pequeños gránulos dispersos por el citoplasma. El núcleo puede desaparecer, dejando una célula anucleada. Se pueden ver los fragmentos citoplásmicos separándose de las células intactas o degeneradas. Se ha señalado que estas formas degeneradas de células epiteliales vacuoladas daban lugar a *pseudopolimorfos* y *micropseudocélulas*, los primeros de los cuales, al parecerse a los PMN, deberían diferenciarse de éstos. Por el contrario, otros investigadores no han apreciado *pseudopolimorfos* en la leche, sino que opinan que dichas formas podrían haber sido confundidas con leucocitos PMN.

Por su parte, LEE *et al.* (1980), en leche de vaca, y LEE y OUTERIDGE (1981), en leche de oveja, observaron que las células epiteliales ductales se caracterizaban por unas microvellosidades cortas y uniformemente distribuidas por toda la superficie, así como por la presencia de muchas fibrillas en el citoplasma.

## II.1. Las células somáticas de la leche

---

DULIN *et al.* (1983b) señalaron que ciertos estudios sobre células somáticas en leche humana indicaron que la mayoría de las células presentes en la glándula, después del segundo mes de lactación, eran epiteliales con función secretora. No obstante, los criterios utilizados para la identificación de dichas células en la leche de vaca podrían aplicarse perfectamente también a los macrófagos (LEE *et al.*, 1980), lo que dificulta la diferenciación entre células epiteliales y macrófagos por microscopía óptica.

La aparición de pequeños grupos de células ductales bien conservadas, tanto en secreciones de vacas secas como en la leche propiamente dicha, parece indicar que su presencia se encuentra más relacionada con la abrasión del epitelio, ocasionada durante el proceso de ordeño, que con una descamación natural durante la lactación (LEE *et al.*, 1980).

### II.1.1.5. OTROS TIPOS CELULARES

Además de los tipos celulares anteriormente descritos, en la leche de los rumiantes pueden encontrarse otros tipos de células (SCHALM *et al.*, 1971):

- **Grandes células escamosas.** Sólo han sido citadas por un pequeño número de autores. Estas células, de forma irregular, son las mayores encontradas en extensiones de leche, pues medían de 25 a 55  $\mu\text{m}$ . En películas teñidas con la tinción de Leishman, el citoplasma aparece de color gris y de aspecto granular, conteniendo, en ocasiones, una cantidad variable de bacterias. El núcleo está intensamente teñido, es pequeño (de 6 a 7  $\mu\text{m}$ ), esférico, elíptico o irregular y contiene una cromatina granular. Sólo se consiguieron observar en un porcentaje pequeño de las muestras de leche normal.
- **Eritrocitos.** Se han visto a menudo en preparaciones de sedimentos de leche centrifugada. Se tiñen como en las extensiones de sangre, pudiendo aparecer ligeramente deformados. Se presentan aislados o en pequeños grupos.
- **Corpúsculos o cuerpos calostrales.** Son grandes células con un núcleo pequeño y un citoplasma lleno de gotas de grasa de diferentes tamaños. Se

piensa que puedan ser células descamadas o degeneradas, o bien células linfoides fagocíticas o leucocitos.

### II.1.2. RESPUESTA CELULAR EN LA MASTITIS

Según lo indicado por LEE y OUTERIDGE (1981), en la leche no infectada de vaca y en la glándula mamaria sana de ovejas secas y en lactación, los macrófagos constituyen el tipo celular más importante que persiste a lo largo del ciclo lactacional. La alta concentración de PMN en el calostro bovino (LEE *et al.*, 1980) y en la secreción de la mama ovina al inicio de su involución es solamente un fenómeno transitorio, pues estas células disminuyen en número durante la lactación y dentro del período involutivo.

Cuando una glándula mamaria es infectada por un patógeno, el RCS se incrementa drásticamente, y los porcentajes de cada tipo de ellas sufren fuertes variaciones. Así, en el calostro, el incremento de los RCS se traduce en una elevación logarítmica del porcentaje de PMN, mientras que para los otros tipos celulares se observa una disminución potencial del porcentaje de células degeneradas, de linfocitos y de macrófagos (GONZALO *et al.*, 1988). Como indican estos autores, las células degeneradas constituyen el tipo celular predominante del calostro cuando los RCS totales son inferiores a  $700 \times 10^3$  cél./ml, mientras que, por encima de este valor, los PMN representan la categoría más frecuente, en consonancia con LEE y OUTERIDGE (1981), quienes, utilizando la microscopía electrónica, evidenciaron que el tipo celular predominante en el calostro ovino fueron los PMN (41-84%), seguidos por macrófagos (8-49%) y linfocitos (6-11%). Las células plasmáticas estuvieron presentes en un porcentaje muy bajo (1-2%). La aparición de células epiteliales de los conductos fue rara, y no se observaron células secretoras. En consonancia con un alto porcentaje de células degeneradas en este tipo de secreción, reseñado por GONZALO *et al.* (1988), LEE y OUTERIDGE (1981) también encontraron restos celulares, material membranoso y otro tipo de fragmentos (WOODING *et al.*, 1977) procedentes del epitelio secretor.

Por lo que se refiere a la leche, las experiencias de diversos autores en leche de oveja (GONZALO y GAUDIOSO, 1985; LEE y OUTERIDGE, 1981) demuestran que, en la leche procedente de glándulas sanas, el macrófago es el tipo celular

## II.1. Las células somáticas de la leche

---

predominante (46-84%), delante de los PMN (2-28%) y de los linfocitos (11-20%); sin embargo, en leche de cabras no infectadas o con RCS bajos (DULIN *et al.*, 1983a; DULIN *et al.*, 1983b; ROTA *et al.*, 1993), el PMN (52-57%) es más frecuente que el macrófago (19-34%) y que el linfocito (11-14%). Las células epiteliales son raramente observadas en la leche de ambas especies, mientras que las células plasmáticas sólo aparecen en el calostro. Al originarse una infección, los PMN son atraídos a la mama, y su porcentaje en la leche se eleva de forma rápida -más que en el caso del calostro (GONZALO *et al.*, 1988)- en detrimento de los macrófagos y linfocitos (DULIN *et al.*, 1983b; ROTA *et al.*, 1993). Por ejemplo, en la oveja Churra, la Figura II.1 muestra la evolución de la concentración de PMN, linfocitos y macrófagos de la leche a medida que el RCS total aumenta. Por encima de  $200 \times 10^3$  cél./ml, más del 50% de ellas son ya PMN, y este porcentaje rebasa el 90% del total celular por encima de  $3 \times 10^6$  cél./ml (GONZALO y GAUDIOSO, 1985). Ello confirma el papel preponderante de los PMN en el desarrollo de la reacción inflamatoria de la ubre (DULIN *et al.*, 1983b; LE GALL y PLOMMET, 1965; POUTREL y RAINARD, 1982), en tanto que los macrófagos no participarían en la misma, a pesar de su función eminentemente fagocitaria (LEE y OUTERIDGE, 1981), siendo más bien indicadores de un óptimo estado sanitario de la mama (GONZALO y GAUDIOSO, 1985). Esta situación parece casi la misma a la observada en vacas (JASPER, 1980), pero contrasta con la referida a cabras, donde el elevado porcentaje de PMN presentes en la leche de glándulas sanas sugiere una especificidad menor de este tipo de células contra la infección. Concretamente en esta especie, los PMN se incrementan como consecuencia de la infección desde el 45 al 72% en las primeras semanas de lactación y desde el 74 al 86% al final de la misma (DULIN *et al.*, 1983b).

Desde un punto de vista comparativo, y debido al hecho de que los PMN se elevan de forma más acentuada en la leche que en el calostro, GONZALO *et al.* (1988) han indicado que tendría que haber una diferencia de criterios a la hora de interpretar la respuesta fisiopatológica de la ubre en función de la concentración celular del calostro y de la leche, pues los PMN calostrales tendrían más bien un papel fagocitario de restos nucleares, gotas de grasa y fragmentos apicales de células epiteliales secretoras (LEE y OUTERIDGE, 1981) y, por tanto, no serían indicadores, al menos dentro de ciertos límites (hasta las  $700 \times 10^3$  cél./ml), de una reacción inflamatoria de la ubre, como ocurre en el caso de la leche.

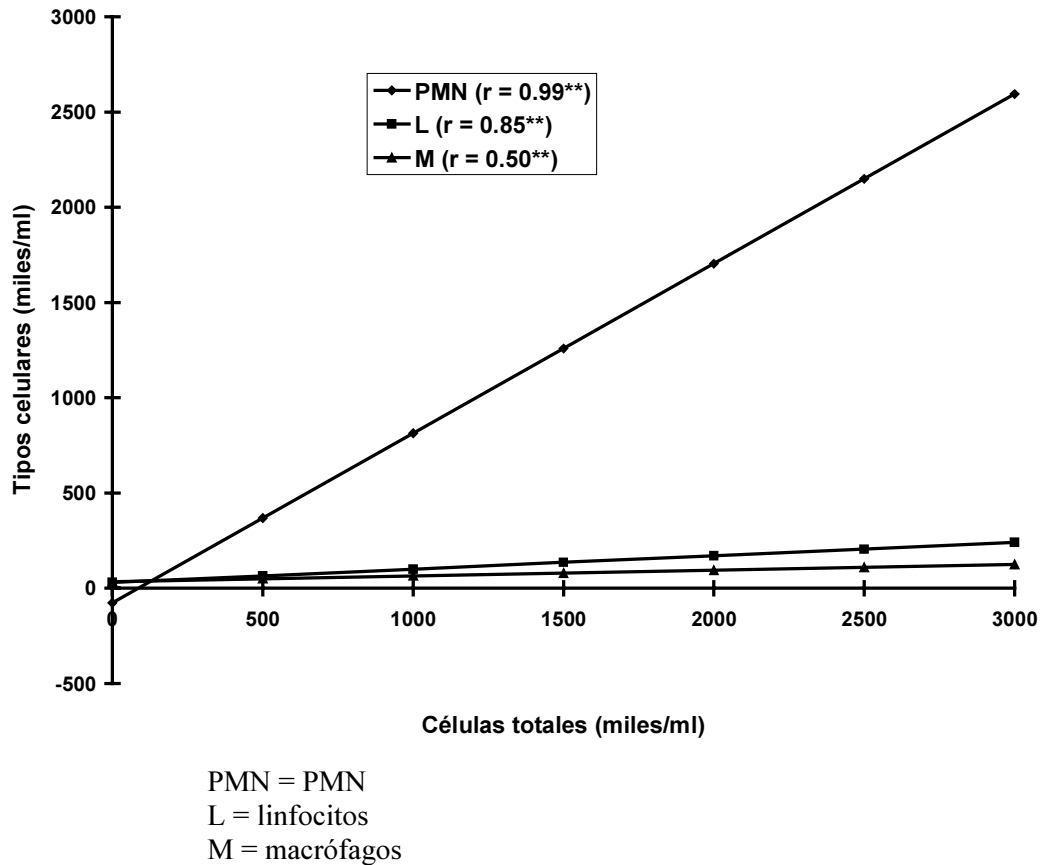


Figura II.1. Líneas de regresión y coeficientes de correlación (r) de las concentraciones de los principales tipos celulares de la leche en función del RCS total en la leche de oveja Churra en mitad de lactación (GONZALO y GAUDIOSO, 1985)

Según señalan GONZALO *et al.* (1988), las células degeneradas y/o difíciles de clasificar, que adquirirían una máxima importancia en el calostro, presentan un interés escaso en la leche, pues en ningún caso alcanzan el 10% de participación en el conjunto total de células, lo cual, si bien está en desacuerdo con los resultados de SCHALM *et al.* (1971), que encuentran un 18-25% de células degeneradas en la leche de vaca, concuerda con LEE y OUTERIDGE (1981) y GONZALO y GAUDIOSO (1985) en leche de oveja.

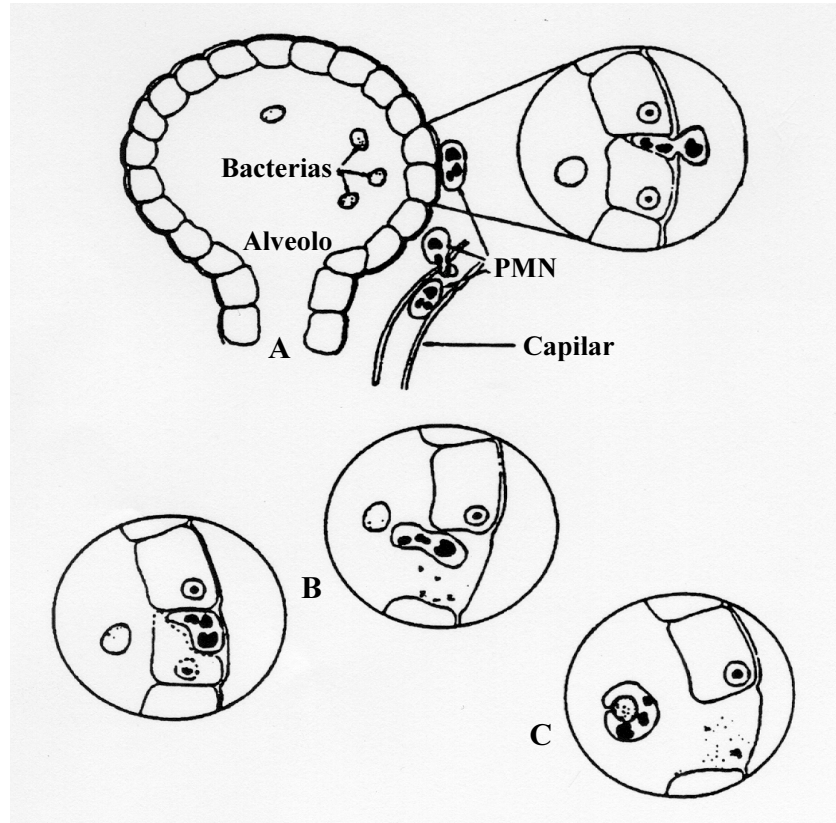
## II.1. Las células somáticas de la leche

---

Como ya hemos visto, el mecanismo por el cual se produce este incremento del RCS en la leche, en caso de infección, parece muy similar en la oveja y en la vaca. La secuencia de hechos en una respuesta inflamatoria localizada es la siguiente, según AMORENA *et al.* (1992): el agente causal (toxina o bacteria) genera mediadores preinflamatorios, los cuales afectan a la circulación local abriendo las uniones interendoteliales y produciendo la subsiguiente exudación de plasma, con la aparición de un edema. Estos mediadores también activan a los PMN sanguíneos y al endotelio, incrementando su afinidad mutua y permitiendo que los PMN se marginen del flujo sanguíneo para atravesar las paredes del endotelio. Tras la extravasación, estos PMN se mueven hacia el agente causal siguiendo un gradiente de concentración del mismo o de otro mediador preinflamatorio. Los PMN son los primeros leucocitos que migran al lugar de la infección, pero en estadios más avanzados del proceso inflamatorio también lo hacen los fagocitos mononucleados, los linfocitos y las plaquetas. Los PMN pueden, a su vez, ampliar el proceso al liberar mediadores de la inflamación (DALE y FOREMAN, 1984; WILKINSON, 1984).

Tradicionalmente se pensaba que, en este punto, los leucocitos eran capaces de forzar los complejos de unión intercelular que mantienen unidas a las células epiteliales secretoras, pasando así a la luz alveolar. Actualmente se sabe que un rápido tránsito celular al interior alveolar no se produce hasta que las células secretoras mueren y se desprenden de la membrana basal que rodea el alveolo (HEALD, 1985). El resultado es la formación de puertas abiertas a la migración leucocitaria y a otros componentes sanguíneos desde el espacio tisular perialveolar a la leche alveolar (Figura II.2).

La causa de la muerte celular de una o varias células del epitelio secretor es incierta, si bien estas pérdidas resultan en una disminución del potencial secretor mamario, pues no pueden ser reemplazadas hasta el período seco entre lactaciones. Por tanto, la medida de las células somáticas en la leche es tanto un método indirecto -pero sensible y específico- para detectar la inflamación de la ubre, como una herramienta para estimar las pérdidas del potencial productivo debidas a las mastitis subclínicas. A este respecto, la relación entre el RCS y la producción lechera ha sido estudiada tanto en el ganado vacuno (RENEAU, 1986) como en el ovino lechero (GONZALO *et al.*, 1994), permitiendo la proposición de modelizaciones matemáticas de estimación de pérdidas productivas en función del RCS individual de los animales.



- A: leucocitos PMN llegando a un alveolo infectado.
- B: creación de poros de penetración de los leucocitos a la luz del alveolo.
- C: fagocitosis bacteriana.

Figura. II.2. Mecanismo de migración leucocitaria desde la sangre a la luz alveolar (HEALD, 1985).

Debido precisamente a la significación comentada y a la facilidad y rapidez de procesamiento de las muestras mediante contadores automáticos de células, las asociaciones de ganaderos de vacuno lechero, que persiguen una mejora de sus rebaños, han incluido el RCS de la leche como un objetivo más dentro del control lechero mensual cualitativo. Al constituir el RCS un parámetro de calidad higiénica y sanitaria de la leche, se han desarrollado programas de incentivación para el pago de la leche de vaca a los ganaderos con bajos RCS. A través de la Directiva 92/46/CEE, el Consejo de las Comunidades Europeas ha establecido una norma, referente al

contenido de células somáticas, que afecta a la leche cruda de vaca en las explotaciones de producción o en el momento de la recepción de la leche cruda en el establecimiento de tratamiento o de transformación. Sin embargo, la Unión Europea no ha establecido una norma semejante en el caso de la leche de oveja, debido fundamentalmente a la escasa información sobre el comportamiento de esta variable en esta especie. Por lo tanto, es necesaria una profundización en el conocimiento de la misma, con el fin de brindar los elementos decisivos, tanto técnicos como científicos, que permitan el establecimiento de una norma para la leche cruda de oveja.

### II.1.3. PRESENCIA DE PARTÍCULAS CITOPLASMÁTICAS

De forma similar a como ocurre en la leche de mujer (BROOKER, 1980), la presencia de PC en leche de cabra (SCHALM *et al.*, 1971; WOODING *et al.*, 1970) es el resultado de la secreción de carácter marcadamente apocrino que tiene lugar en la glándula mamaria de ambas especies.

Dichas partículas son grandes fragmentos de citoplasma originados a partir de la porción distal de las células secretoras alveolares y son similares en tamaño (5-30  $\mu\text{m}$  de diámetro) a los leucocitos de la leche. Contienen abundante material granular ARN-positivo (asociado a cisternas dilatadas del retículo endoplásmico rugoso), gran cantidad de proteínas, algunos lípidos, pero carecen de ADN (DULIN *et al.*, 1982b; WOODING *et al.*, 1970). Su frecuencia no se ve afectada ni por el grado de infección intramamario ni por el estado de lactación, aunque su número sí es significativamente más elevado en los animales de primera lactación, probablemente por un efecto de concentración, puesto que en ellos la producción de leche es menor (DULIN *et al.*, 1983b). SIERRA *et al.* (1996a), en estudios realizados sobre cabras de raza Murciano-Granadina, detectaron un porcentaje de PC sobre el total celular que oscilaba alrededor del 30%.

En leche de ganado vacuno exenta de patógenos, BROOKER (1978), centrifugando a 1.000 x g durante 10 minutos distintas muestras lácteas, obtuvo un sedimento que, observado al microscopio electrónico, presentaba gran cantidad de micelas de caseína y, en menor medida, también pequeños glóbulos grasos, núcleos libres y vesículas membranosas. A pesar de haber hallado también leucocitos, el número de fragmentos celulares anucleados fue mayor. Éstos se encontraban en todos



los sedimentos examinados, pero había una variación considerable en su cantidad de una muestra a otra, y, aunque no de forma invariable, aparecían en número más elevado en leche de repaso que en la procedente de los primeros chorros, y en la obtenida durante las 4-6 primeras semanas de lactación que en la de estadios posteriores. Dichos fragmentos eran comunes en calostro preparto y posparto y medían 1-4  $\mu\text{m}$  a lo largo de su eje mayor; presentaban una forma muy variada y una unidad de membrana completa a su alrededor. La membrana de uno de los lados de cada fragmento se encontraba fuertemente replegada, originando un gran número de microvellosidades que contenían una matriz citoplasmática de densidad electrónica algo variable y cuya longitud difería de unos fragmentos a otros. En algunas muestras, los fragmentos se veían en pequeños grupos de 2 a 3.

El grado de conservación estructural del citoplasma variaba en esos fragmentos celulares bovinos, pero con frecuencia se identificaron vacuolas con gránulos electrónicamente densos parecidos a micelas de caseína y pequeñas vesículas. De igual modo, se apreciaron ocasionalmente gotas de grasa citoplasmática. En algunos fragmentos se distinguían claramente áreas de densidad electrónica mayor, con una estructura interna marcadamente fibrilar, frecuentemente adyacentes a la membrana y, en ocasiones, introducidas levemente dentro de las microvellosidades marginales. También se descubrieron mayores fragmentos citoplasmáticos sin microvellosidades y de estructura interna distinta, pero su presencia no era constante en los sedimentos citados (BROOKER, 1978).

Estos resultados indican que tales fragmentos celulares provistos de numerosas microvellosidades son componentes permanentes de la leche de vaca (BROOKER, 1978) y corroboran los datos expuestos por PAAPE y TUCKER (1966), que mostraron una mayor presencia de fragmentos con ARN en leche de repaso que en la procedente de los primeros chorros.

Otros autores han descrito, igualmente, pequeños fragmentos citoplasmáticos en la leche de vaca (ANDERSON *et al.*, 1975; LEE *et al.*, 1980). Sin embargo, tales fragmentos celulares difieren marcadamente en tamaño, forma y estructura interna de los encontrados en leche de cabra (WOODING *et al.*, 1970). En efecto, en la leche de cabra, la similitud entre la estructura interna de las PC y la de las células secretoras de la glándula mamaria caprina hizo sugerir a estos autores que los fragmentos habrían formado parte del citoplasma apical de la célula secretora y que se habrían desprendido ante fuerzas externas, como ocurre durante la contracción de las células

## II.1. Las células somáticas de la leche

---

mioepiteliales, hipótesis que queda bastante consolidada ante el hecho de que el número de los citados fragmentos se incrementara después de una inyección de oxitocina. Además, no parece que fueran células mamarias degeneradas, pues no contenían evidencia alguna de la existencia de un núcleo y, por el contrario, sí presentaban una membrana bien conservada; tampoco parece que fueran porciones de leucocitos, ya que su citoplasma carecía de gránulos neutrófilos y de vesículas fagocíticas.

Sin embargo, la confirmación de un origen similar de los fragmentos celulares en leche bovina resulta difícil, debido a su pequeño tamaño, escasez de orgánulos y diferente organización interna, comparativamente con la de las células epiteliales de la glándula mamaria (BROOKER, 1978). Este autor citó la pérdida de fragmentos citoplasmáticos por parte de las células alveolares en la glándula mamaria bovina, pero no hay ninguna evidencia directa al microscopio electrónico que haga sugerir que dicho proceso dé lugar a fragmentos similares a los encontrados en leche. A pesar de ello, la inclusión ocasional de lípidos endógenos y de supuestas micelas de caseína sugiere un origen, aunque remoto, a partir de las células secretoras de los alveolos o de los pequeños conductos. Si esto fuese así, la posesión de numerosas microvellosidades requeriría alguna explicación, porque, aunque las células epiteliales que recubren el seno del pezón, el seno galactóforo, los conductos y los alveolos posean microvellosidades apicales, en ningún caso éstas son tan largas o tan numerosas como las observadas en los fragmentos de la leche. Una posibilidad sería que ellas aumentarían, o que se incrementara su longitud después de su separación de las células de procedencia. La activación de ciertos elementos contráctiles citoplasmáticos ante un flujo de iones  $\text{Ca}^{2+}$ , resultantes de un proceso degenerativo de la permeabilidad de la membrana, podría ser concebido como un mecanismo que provocaría el plegamiento de la misma.

## II.2. MÉTODOS DIRECTOS DE RECUENTO CELULAR EN LA LECHE

---

### II.2.1. MÉTODO MICROSCÓPICO DIRECTO

Este método fue desarrollado ya en 1910 por Prescott y Breed con el fin de determinar el número de cuerpos celulares presentes en la leche. Se trata básicamente de la extensión de 0,01 ml de leche, dosificada con una pipeta especial, sobre un área de 1 cm<sup>2</sup> dibujada en un portaobjetos. Una vez seca, tal extensión es teñida con AM, procediéndose al recuento, con el objetivo de inmersión, de las células presentes en un número representativo de campos microscópicos. El resultado es expresado como el número de células que hay por mililitro de leche, tras la correspondiente transformación algebraica (SCHALM *et al.*, 1971).

Este método, conocido comúnmente como método de Breed, no ha sido siempre uniformemente aplicado por los diferentes autores, sufriendo variaciones derivadas de las necesidades específicas o de las limitaciones temporales de los investigadores. Algunos de ellos lo han evaluado críticamente al existir considerables posibilidades de error, incluso en circunstancias excepcionalmente cuidadosas, como consecuencia de los diversos factores técnicos que pueden incidir sobre el RCS final (PAAPE *et al.*, 1963) y que aconsejan una escrupulosa estandarización del método con el fin de poder cotejar resultados.

#### II.2.1.1. FACTORES DE VARIACIÓN

Los estudios citados por SCHALM *et al.* (1971) pusieron de manifiesto la necesidad esencial de establecer un procedimiento estandarizado de RCS con la

finalidad de poder obtener resultados uniformes. Los resultados de estos estudios, conducentes a la obtención de un protocolo unificado, son resumidos a continuación:

### A) Toma de muestra para la extensión

El procedimiento seguido durante la toma de 0,01 ml de leche a partir de una muestra de mayor volumen puede ser causa de numerosas fuentes de error del RCS. En efecto, un número de células variable se localiza en la capa de nata, debido, en parte, a la opuesta carga eléctrica portada por los glóbulos grasos y los leucocitos, lo que conduce a variaciones de la concentración celular en diferentes porciones de la muestra de leche. En la leche fría, los racimos de glóbulos grasos y de células son mayores y tienden a ascender a la superficie más rápidamente que en la leche a temperatura ambiente o mayor. Siempre que la concentración de células es más elevada en la parte superior de la leche, como sucede en una muestra que no ha sido agitada convenientemente, el uso del asa estandarizada para realizar la extensión podría dar lugar a RCS altos. La inversión de 3 a 5 veces de la muestra de leche no resulta suficiente para conseguir una adecuada distribución de las células, que se logra tras 15 a 25 movimientos de inversión. Los movimientos deben realizarse muy cuidadosamente, con el fin de evitar la formación de burbujas de aire y de espuma, especialmente en el momento de la recogida de la alícuota, tras la homogeneización de la leche. Se pueden tomar muestras de leche después de unos pocos minutos de su agitación, sin que haya diferencias significativas en el RCS. La temperatura de la leche también resulta importante, ya que, si bien los RCS obtenidos a partir de leche mantenida a temperatura ambiente o calentada a 60° C fueron similares, resultaron, sin embargo, inferiores a los obtenidos con leche refrigerada bien homogeneizada.

Prescott y Breed utilizaron una pipeta especial para medir 0,01 ml de leche, aunque otros autores han venido utilizando una jeringa especial o un asa de platino. Aunque algunos estudios comparativos no traducen diferencias estadísticas en el RCS obtenido en función de los tres instrumentos (BLACKBURN *et al.*, 1955), conviene decir que la medición de una cantidad exacta de leche mediante el asa de platino varía con el ángulo de incidencia y con la velocidad de retirada de la misma. A medida que el ángulo entre el asa y la superficie de la leche disminuye, se recoge un volumen mayor, hasta el punto de que este volumen es máximo cuando la superficie plana del asa es llevada a una posición casi horizontal, a modo de *cuchara*. Por otra parte, una

retirada del asa demasiado lenta se traduce en una pérdida de leche, pudiendo desprenderse la extensión si fuera demasiado delgada. Contrariamente, una retirada rápida produce la retención de una excesiva cantidad dentro del asa. De manera que, para una extracción óptima, el asa debe ser retirada rápidamente y en una posición vertical con respecto a la superficie de la leche.

### **B) Superficie de extensión**

Evidentemente, las variaciones del área sobre la cual la leche es extendida pueden originar diferencias en el RCS. Los bordes de la extensión se contraen ligeramente y se hacen más finos durante el secado. Si bien Prescott y Breed encontraron una distribución celular uniforme, excepto cuando no lograban un secado rápido, otros autores detectaron de 1,5 a 1,7 veces más células en el tercio central que en los otros tercios de la preparación, lo cual fue probablemente debido a la migración de las células hacia el centro de la preparación durante el secado de la película de leche. En consecuencia, para compensar esta mayor distribución de las células en el centro, se ha sugerido que se cuente el 60% de los campos a partir de las áreas periféricas y el 40% restante en el centro de la extensión. Estos mayores recuentos de la parte central o de aquellas porciones donde se inicia o detiene la realización de la extensión han sido confirmados por varios autores (SCHNEIDER y JASPER, 1966a) y son fácilmente constatables para cualquier persona que realice esta técnica. Adicionalmente, mayores RCS fueron también obtenidos cuando se realizaron extensiones sobre áreas superiores a 1 cm<sup>2</sup>. Este aspecto es de gran interés, pues en leches con altos contenidos en extracto seco, como la de oveja, pudiera cometerse fácilmente el error de realizar la extensión sobre una mayor superficie, con el fin de facilitar la adhesión de la misma al porta y la acción del desengrasante; sin embargo, el RCS resulta incrementado. Con respecto a la distribución de las células en extensiones secadas a temperatura ambiente o a 37° C, ésta fue similar en ambos casos.

### **C) Calibración del microscopio, factor de trabajo y número de células de la muestra**

El diámetro del campo microscópico, visto a través del objetivo de inmersión, debe ser medido usando un portaobjetos de escala micrométrica (micrómetro

## II.2. Métodos directos de recuento celular

objetivo) con divisiones de 0,1 y 0,01 mm. El área del campo es calculada usando la fórmula  $\pi r^2$ . Por ejemplo, si el diámetro es 0,16 mm (0,016 cm), el área del campo será  $3,1416 \times 0,008^2 = 0,0002$  ó  $1/5.000 \text{ cm}^2$ . Como el volumen de leche extendido sobre una superficie de  $1 \text{ cm}^2$  es de 0,01 ml (1/100), el posible número de campos que están contenidos o que pueden ser contados en  $1 \text{ cm}^2$  es 5.000 para el microscopio usado en este ejemplo. El volumen de leche representado por cada campo debería ser  $1/5.000 \times 1/100 = 1/500.000 \text{ ml}$ . Por tanto, cada célula contada o vista en un campo elegido de forma aleatoria debería equivaler a 500.000 células/ml de leche. Esta equivalencia es denominada *factor del microscopio*.

El *factor de trabajo* es calculado dividiendo el factor del microscopio entre el número de campos que sean contados. Así, para el microscopio que nos sirve de ejemplo, los factores de trabajo para 10, 50, 100 y 200 campos contados serían de 50.000, 10.000, 5.000 y 2.500, respectivamente. Si, por ejemplo, se cuentan 100 campos, el número de células por mililitro de leche sería el resultado de multiplicar el número total de células por un factor de trabajo de 5.000. En los análisis rutinarios de leche, deberán contarse el número de células en, al menos, 25 campos, con un factor de trabajo de 20.000, deslizando horizontalmente el portaobjetos desde un borde de la extensión hasta el opuesto, pasando por el centro. Para una mayor precisión deberán contarse otros 25 campos en sentido vertical a través de la extensión, de manera similar a la anterior (SCHALM *et al.*, 1971).

La precisión del método MD es dependiente del factor de trabajo y del número de células de la muestra de leche (SCHNEIDER y JASPER, 1966b). A medida que disminuye el factor de trabajo, aumenta la precisión, e igualmente, para un factor de trabajo constante, la precisión será mayor cuanto más elevada sea la concentración celular. Prescott y Breed usaron un factor de trabajo de 5.000 y encontraron una variación del 15% entre RCS duplicados, mientras que otros autores (SCHNEIDER y JASPER, 1966b) refirieron mayores variaciones utilizando factores de trabajo entre 7.500 y 500.000. La elección del factor de trabajo debe ser función del número aproximado de células en la muestra y de la fiabilidad deseada. Un factor de trabajo de 5.000 puede dar una buena estimación del contenido celular, pero valores mayores o menores pueden estar indicados bajo ciertas circunstancias. Un bajo factor requiere contar un elevado número de campos, pero ofrece un RCS menos erróneo, especialmente con leche de bajo contenido celular. Debería ser deseable encontrar un compromiso entre precisión y rapidez analítica.

#### **D) Criterios para llevar a cabo el recuento celular**

SCHNEIDER y JASPER (1966a) estudiaron diferentes criterios para la determinación de las estructuras que podrían considerarse células, llegando a establecer los siguientes:

1. Se considera como célula todo el material teñido que contenga más del 50% de un núcleo celular. Esto es también aplicable a aquellas células que sólo sean vistas de forma parcial en el margen de un campo microscópico.
2. No se contarán como células los fragmentos celulares más pequeños y el material citoplásmico.
3. Se contarán todas las células individuales existentes en agregados celulares, siempre que el RCS total del campo no exceda el RCS más elevado obtenido en cualquiera de los otros campos sin agregados. En los campos con agregados, el RCS no puede superar, en ningún caso, el mayor RCS observado en campos sin agregados.

Los RCS obtenidos mediante el método MD tienden a disminuir a medida que aumenta la edad de la leche, debido a la pérdida de la integridad celular y a la fragmentación. El mayor descenso tiene lugar entre los días 1 y 2 de almacenamiento. Los recuentos declinan más rápidamente en muestras con menor número de células (SINGH y MARSHALL, 1966). Después de 2-3 días, los RCS ya no son fiables porque habría que tomar demasiadas decisiones arbitrarias para considerar a cada una de las partículas que aparecieran como células o no. Así, los resultados serían difíciles de relacionar consistentemente con el RCS de la leche fresca (KROGER y JASPER, 1967).

#### **E) Diferencias específicas y métodos de tinción**

Actualmente, tal y como recoge la Norma Internacional 148A (FIL-IDF, 1995), este método ha sido perfectamente estandarizado y constituye el método de referencia para el RCS, tanto de la leche cruda como de la leche con conservantes químicos. Dicha norma es bastante completa y hace referencia a la preparación del colorante (AM), aparataje, muestreo, procedimiento analítico, preparación de la

## II.2. Métodos directos de recuento celular

---

muestra a analizar, calibración del microscopio, modo operativo, expresión de los resultados y control de calidad. Es necesario precisar que este método de referencia, tal y como figura en la norma, está diseñado específicamente para leche de vaca, y su aplicación a la leche de oveja probablemente requerirá de ciertas adaptaciones. En efecto, apenas existe información sobre la influencia que el material membranoso extracelular y las PC de la leche de oveja puedan tener en la cuantificación del RCS de la leche teñida con colorantes inespecíficos, como el AM. A ello se une el diferente extracto seco de la leche de oveja comparado con el de la vaca, lo que ocasiona problemas de adherencia de la extensión de leche a la superficie del porta o, incluso, de penetrabilidad de los colorantes.

Como ya se señaló en la Introducción, las experiencias previas en la leche de cabra han sido determinantes, ya que algunos autores (DULIN *et al.*, 1982b; PETERSEN, 1981; POULTREL y LERONDELLE, 1983; SHELDRAKE *et al.*, 1981) han encontrado diferencias entre los RCS obtenidos, por un lado, mediante los métodos basados en el recuento electrónico de partículas o los métodos MD que usan tinciones no-específicas (por ejemplo: el AM), que no distinguen entre células propiamente dichas y PC, y, por otro lado, los obtenidos mediante métodos ADN-específicos, tales como el filtrado de ADN a través de membrana, el método FOE y el método MD con tinciones específicas de ADN y ARN -como la PVM y la tricrómica de Gallego (CONTRERAS *et al.*, 1998; SIERRA *et al.*, 1996a; SIERRA *et al.*, 1996b)-. Por su parte, en la leche de vaca, la tinción PVM se tradujo en una disminución del 50% de la varianza del RCS comparativamente a la tinción de Wright (PAAPE *et al.*, 1963). En consecuencia, cabría la posibilidad de que el método de tinción se tradujera en variaciones importantes de RCS en la leche de oveja, por lo que resulta indicado un estudio al respecto en esta última especie.

### II.2.1.2. DETERMINACIÓN DE CÉLULAS VIABLES EN LA LECHE

SCHALM *et al.* (1971) han indicado que los estudios efectuados sobre las actividades fagocíticas y bactericidas de los leucocitos en la leche han suscitado un gran interés en aquellos aspectos relativos al papel que desempeñan en los procesos mastíticos (ver epígrafe II.1.1). Como sólo los leucocitos viables son capaces de fagocitar y destruir las bacterias, la proporción relativa de células viables y no-viables



en una muestra podría tener una importante relación con la significación de un recuento leucocitario dado. Con este fin, se ha hecho uso de varios métodos para la detección de células viables en los fluidos corporales. Asimismo, se ha descrito una tinción vital de leucocitos y bacterias en la leche mediante naranja de acridina (STRUGGER, 1945, 46). SCHALM *et al.* (1971) señalan, igualmente, la utilización de un método simple y rápido para la diferenciación de células somáticas viables y muertas en la leche por medio de la utilización del colorante tripán azul, con el que las células muertas se tiñen de color azul, mientras que las viables aparecen sin coloración, como objetos redondos refráctiles conteniendo núcleos. Sin embargo, tales tinciones no han supuesto, hasta la fecha, una mejora efectiva con relación a las tinciones clásicas, por lo que su uso se reserva a un ámbito experimental.

### II.2.2. MÉTODO FLUORO-OPTO-ELECTRÓNICO

Desde un punto de vista rutinario, es evidente que el método MD presenta ciertas limitaciones. En consecuencia, se han buscado métodos precisos, rápidos y menos tediosos para el RCS de la leche, entre los cuales cabe destacar el método FOE.

Básicamente se trata de un microscopio de fluorescencia de funcionamiento continuo, mediante el que se realiza el recuento de las células somáticas que previamente han sido teñidas por un colorante específico del ADN nuclear, como es el bromuro de etidio, con el que forma un complejo fluorescente. Una vez teñida, cada célula origina un pulso eléctrico al ser irradiada por un haz de luz azul, el cual es amplificado y registrado digitalmente (SCHMIDT-MADSEN, 1975).

#### II.2.2.1. PRINCIPIO

Cuando ciertos colorantes son sometidos a una excitación luminosa, sus moléculas tienen la propiedad de emitir una radiación cuya longitud de onda es más elevada que la longitud de onda de la luz absorbida: es el fenómeno denominado *fluorescencia*. El colorante utilizado en el método FOE es el bromuro de etidio ( $C_{21}H_{20}BrN_3$ ; PM = 394,32). Cuando este colorante se mezcla con la leche, se forma

## II.2. Métodos directos de recuento celular

---

un complejo con el ADN celular. La banda de longitud de onda utilizada para el haz luminoso de excitación es de 400-570 nm (luz azul), siendo la máxima absorción del complejo ADN-bromuro de etidio a 520 nm. La emisión de luz fluorescente queda limitada, con la ayuda de un filtro interferencial, a una banda de 530-700 nm (luz roja) (GRAPPIN y JEUNET, 1974).

Una parte del colorante podría, igualmente, combinarse con los grupos fosfato de la membrana del glóbulo graso, pero el complejo formado emite la luz fluorescente a una longitud de onda inferior (verde-amarilla) a la emitida por el complejo ADN-colorante. Por el contrario, las bacterias que absorben el colorante emiten una luz roja semejante a la emitida por las células somáticas; no obstante, la intensidad luminosa emitida por dichas bacterias no puede alcanzar el mismo grado que el de las células, salvo que se trate de agregados microbianos (GRAPPIN y JEUNET, 1974).

El RCS se realiza mediante un microscopio de funcionamiento continuo y de haz incidente, de forma que tanto la iluminación como la observación del objeto tienen lugar a través del mismo objetivo. La fuente luminosa, que es una lámpara de arco de xenon, se enfoca a través de un sistema óptico y se filtra para proporcionar luz de excitación azul. La luz viene reflejada mediante un espejo y se enfoca sobre el líquido, que transcurre perpendicularmente al objetivo del microscopio. Cuando pasan debajo de éste, las células somáticas, que han reaccionado con el colorante, son excitadas por la luz azul y emiten, por consiguiente, fluorescencia roja, la cual es captada por un fotomultiplicador, que transforma la señal luminosa en una señal eléctrica, que se registra en un osciloscopio, en una unidad de lectura digital y, en ciertas ocasiones, en una impresora (CASADO y GARCÍA, 1986).

### II.2.2.2. EQUIPOS DESARROLLADOS

Actualmente existen en el mercado numerosos aparatos que utilizan el principio de numeración FOE. Tal y como se observa en la Tabla II.1, los diferentes tipos y marcas de aparatos pueden clasificarse básicamente en función de dos características técnicas, como son: el tipo de citometría, de flujo o sobre disco, y el tipo de umbral, variable o fijo. En el primer caso, las diferencias se establecen a la hora de efectuar el RCS sobre la película de líquido preparada sobre el canto de un disco rotatorio bajo el microscopio de fluorescencia, o bien sobre un capilar que

obliga al tránsito individualizado de las células. Por lo que respecta al tipo de umbral, los aparatos de umbral variable se diferencian de los de umbral fijo en que aquéllos pueden adaptar el nivel discriminatorio de la ganancia de los pulsos en función del grado de conservación, de la supuesta fragmentación celular o del “ruido de fondo”; en definitiva, de cada muestra de leche.

Tabla II.1. Principales series de equipos que utilizan el método FOE para el RCS

Fabricante	Aparato	Principio	Umbral
Foss Electric	Fossomatic 90 <sup>®</sup>	Citometría sobre disco	fijo
Foss Electric	Fossomatic 180 <sup>®</sup>	Citometría sobre disco	variable
Foss Electric	Fossomatic 215 <sup>®</sup>	Citometría sobre disco	variable
Foss Electric	Fossomatic 250 <sup>®</sup>	Citometría sobre disco	variable
Foss Electric	Fossomatic 360 <sup>®</sup>	Citometría sobre disco	variable
Foss Electric	Fossomatic 400 <sup>®</sup>	Citometría sobre disco	variable
Foss Electric	Fossomatic 5000 <sup>®</sup>	Citometría de flujo	variable
Bentley	Somacount 150 <sup>®</sup>	Citometría de flujo	variable
Bentley	Somacount 500 <sup>®</sup>	Citometría de flujo	fijo

Aunque en alguno de los equipos (por ejemplo: el Fossomatic 90<sup>®</sup>) la presentación de las muestras al aparato es manual, la mayoría de ellos son analizadores totalmente automatizados con elevadas capacidades analíticas a la hora (180, 215, 250, 360, etc. muestras/hora). Asimismo, estos aparatos pueden operar como equipos individuales o combinados con otros (por ejemplo: un Milko-Scan<sup>®</sup>), lo que permite obtener una amplia información analítica de cada muestra en un corto período de tiempo.

### II.2.2.3. FACTORES DE VARIACIÓN

Los principales factores de variación referidos en la bibliografía sobre este método de recuento son: el tipo de conservante utilizado, el método de almacenamiento de la leche, la edad de la muestra de leche, la temperatura de análisis y el efecto de arrastre de una muestra sobre la siguiente.

#### A) Conservación de la leche

Para preservar la leche con fines analíticos rutinarios se han venido empleando varias sustancias y fórmulas (ARDÖ, 1982; DUNHAM *et al.*, 1978; NG-KWAI-HANG y HAYES, 1982; SANDHU *et al.*, 1984; SCHMIDT-MADSEN, 1979; ZAKIR *et al.*, 1984) que satisfacen los requerimientos básicos, aunque las investigaciones para conseguir el conservante ideal todavía continúan.

KROGER (1985) ha indicado que el requerimiento mínimo que debe cumplir un conservante químico adecuado para muestras de leche es que asegure la *estabilidad* de la muestra, es decir, que asegure que dicha muestra mantenga su composición original desde el momento del ordeño hasta el momento del análisis, y que la sustancia no afecte al resultado del procedimiento analítico. Otros requerimientos son:

- **Actividad de amplio espectro.** Cuanto mayor sea el espectro de acción, mayor será su utilidad; por ello, debería ser efectivo contra todo tipo de microorganismos que pudieran aparecer.
- **Niveles inhibitorios mínimos.** El conservante debería ser efectivo a bajas concentraciones en la leche para minimizar tanto la dilución de la muestra como el coste de la conservación, así como para facilitar los procedimientos de manejo.
- **Elevada solubilidad en agua.** Dado que el porcentaje medio de agua presente en la leche es del 87%, es imprescindible que el conservante tenga la capacidad de actuar allí donde se encuentren los microorganismos, como, por ejemplo, la fase acuosa; además, aseguraría una fácil disolución sin necesidad de una agitación excesiva.

- **Estabilidad.** Debe ser estable bajo condiciones de almacenamiento.
- **Presencia de color.** Una cualidad deseable de la leche conservada es que esté provista de color, entre otros motivos, por razones de seguridad, derivada de su fácil identificación.
- **Compatibilidad.** Un buen conservante debería ser tan efectivo en leche de tanque como en leche individual y ser adecuado tanto para muestras ricas en grasa como para las que contienen un porcentaje bajo de la misma.
- **Vida útil apropiada.** Tendría que ser efectivo durante un período razonablemente largo de tiempo, en razón de los imponderables que pudieran dilatar el procesado analítico.
- **Baja toxicidad.** No debe ser alergénico ni exhibir toxicidad demostrable hacia los manipuladores. Además, sus imprescindibles propiedades biocidas no deberían constituir un riesgo para el medio ambiente.
- **Bajo coste.** La forma sólida -en tabletas o en polvo, por ejemplo- es preferible a la forma líquida, debido a la dificultad inherente de manejo de líquidos y a la mayor precisión a la hora de dosificar los sólidos.

Los principales conservantes que se han venido utilizando en la leche son los siguientes (KROGER, 1985):

#### **Peróxido de hidrógeno**

Es el conservante tradicionalmente empleado para inhibir la proliferación microbiana y la alteración de la leche. No obstante, debido a su efectividad relativamente poco duradera y al hecho de ser líquido, no resulta adecuado.

#### **Cloruro mercúrico**

Es un sublimado corrosivo. Fue aprobado en los Estados Unidos como conservante de muestras de leche cruda. A menudo se vendía en forma de tabletas que contenían, además, otros agentes oxidantes. Hacia el final de los años sesenta su uso fue interrumpido a causa de la evidencia de que constituía un peligro ambiental. Aparte de eso, su relativamente elevada toxicidad lo convierte en un riesgo laboral. Además, su poder corrosivo contribuye al deterioro del material en los laboratorios de análisis instrumental.

### **Formaldehído**

Es un líquido cuyo empleo ha llevado a resultados erróneos cuando se hacían determinaciones lácteas de proteínas; por ello, ha sido refutado como un conservante efectivo en la leche.

### **Dicromato potásico**

Después de la prohibición del cloruro mercúrico, el dicromato potásico fue adoptado como el conservante preferido. Presenta un color rojo-anaranjado brillante debido a la formación del ion dicromato ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^-$ ). No es higroscópico ni delicuescente. Tiene un amplio número de usos industriales, siendo empleado en Farmacia como un agente oxidante (MERCK & CO., INC., 1976).

Aunque ha sido evaluado mediante diferentes pruebas laboratoriales y de campo, ocasionalmente puede resultar problemático. Su estructura molecular contiene cromo VI, que es un conocido irritante capaz de ocasionar, en algunas personas, rinitis, hemorragia nasal y ulceraciones en la mucosa nasal (NATIONAL INSTITUTE FOR OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH, 1975). Es también un potente sensibilizante a dermatitis alérgicas, habiéndose registrado varios grados de eczema en personas expuestas al cromo VI.

### **Azida sódica**

Este conservante ha recibido bastante atención con vistas a reemplazar al dicromato potásico. Según varios estudios, es muy efectivo estabilizando las muestras de leche para la determinación de su contenido en grasa y proteína por distintos métodos. Sin embargo, el mayor problema asociado con este compuesto químico es su capacidad de reaccionar con metales en los sistemas de efluentes, dando lugar a explosiones espontáneas.

### **Bronopol (2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol)**

Es un compuesto químico usado en la industria cosmética y que ya ha sido valorado como conservante de la leche (ARDÖ, 1979), habiéndose comprobado que una disolución del 0,05% de bronopol no resulta irritante ni causa tampoco sensibilización en la piel humana. No obstante, su coste es de los más elevados entre los conservantes apropiados.

### **Otros tipos de conservación**

Entre otras sustancias también mencionadas en la bibliografía tenemos: el West Agro-Chemical Tablet<sup>®</sup> (KROGER, 1985) y el ácido bórico (FIL-IDF, 1995; HAMANN *et al.*, 1991). Por otra parte, también se ha usado una combinación de conservación química y tratamiento con el calor de las muestras, concretamente para la elaboración de patrones y muestras de referencia (SZIJARTO y BARNUM, 1984) para el control de calidad de los laboratorios.

En un estudio realizado por SCHMIDT-MADSEN (1979), comparando los RCS en alícuotas sin y con conservante, este autor observó que, en muestras no preservadas almacenadas a 5° C, los RCS obtenidos con el método FOE se incrementaron un 100% durante las primeras 24 horas posrecogida, un 5% en las 24 horas siguientes, para permanecer más o menos estables hasta, al menos, 80 horas posrecogida. Tras su preservación con dicromato potásico, los RCS se incrementaron más rápidamente, de manera que la estabilidad se alcanzó en torno a las 5-8 horas posteriores a la adición del conservante. Los RCS medios en las muestras preservadas fueron aproximadamente un 10% superiores a los de la leche fresca. Estas diferencias causadas por la adición o no de conservante también han sido constatadas en otros trabajos (COLEMAN y MOSS 1989) y, si bien parecen poco importantes en la evaluación de muestras individuales, podrían convertirse en un problema no despreciable cuando lo que se comparan son diferencias entre regiones o países o cuando se utilizan para la calibración de los contadores automatizados de RCS (GONZALO *et al.*, 1998). A estos hechos se une la posibilidad de que los diferentes tipos de conservantes afecten de forma desigual al RCS final de la leche (BERTRAND, 1996; LEE *et al.*, 1986), o bien desaconsejen su utilización. Así, la preservación con formalina imposibilitó el RCS por el método FOE (SCHMIDT-MADSEN, 1975).

La utilización del calor como conservante también ha sido considerada por SCHMIDT-MADSEN (1979), quien encontró que la preservación de la leche por calentamiento en baño María a 90° C durante 5 minutos no tuvo efectos significativos sobre el RCS de las muestras preservadas, pero incrementó el RCS de las muestras sin conservante.

B) Método de almacenamiento y edad de la muestra de leche

BERTRAND *et al.* (1990) analizan conjuntamente los efectos del envase de transporte de la leche y de la edad de la misma sobre el RCS, encontrando diferencias estadísticas en ambos factores de variación. Sin embargo, en un trabajo posterior el efecto del envase no fue significativo (BERTRAND, 1996).

Tabla II.2. RCS ( $\times 10^3/\text{ml}$ ) de la leche cisternal y alveolar en función del método de almacenamiento, según GONZALO *et al.* (1993)

	Fresca	Refrigerada	Congelada
<b>Leche cisternal</b>	125 <sup>a</sup>	110 <sup>b</sup>	82 <sup>c</sup>
<b>Leche alveolar</b>	201 <sup>a</sup>	192 <sup>b</sup>	145 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c</sup>Letras en la misma fila difieren  $p < 0,05$ .

Tabla II.3. RCS ( $\times 10^3/\text{ml}$ ) medios en función de la edad de la muestra y del método de almacenamiento de la muestra de leche, según GONZALO *et al.* (1993)

RCS $\times 10^3/\text{ml}$	Refrigeración				Congelación		
	1d	3d	5d	7d	1d	7d	15d
<b>Leche cisternal</b>	116 <sup>a</sup>	115 <sup>a</sup>	110 <sup>a</sup>	100 <sup>b</sup>	84 <sup>ab</sup>	78 <sup>a</sup>	85 <sup>b</sup>
<b>Leche residual</b>	204 <sup>a</sup>	196 <sup>ab</sup>	192 <sup>b</sup>	176 <sup>c</sup>	148	140	147

<sup>a,b,c</sup>Letras en la misma fila difieren  $p < 0,05$ ; **d**: día.

En la leche de oveja, tanto el método de almacenamiento como la edad de la leche influenciaron significativamente ( $P < 0,001$ ) el RCS; concretamente, el método de almacenamiento explicó entre el 11,3 y el 12,3% de la varianza del logaritmo del RCS, mientras que la varianza explicada por la edad de la muestra de leche fue del 1,2%. La influencia del método de almacenamiento de la leche se observa en la Tabla



II.2. Así, la congelación, aunque esté limitada a 24 horas, determina una reducción significativa del RCS tanto en la leche de oveja (GONZALO *et al.*, 1993) como en la de vaca (BARKEMA *et al.*, 1997). Esto puede ser de importancia en estudios bacteriológicos, donde la congelación de las muestras de leche se usa con alguna frecuencia.

Al mismo tiempo, el efecto de la edad de la leche, tanto en refrigeración como en congelación, puede apreciarse en la Tabla II.3, con descensos del 14% desde el día 1 hasta el 7, en condiciones de refrigeración, y del 28 al 34%, en caso de congelación.

### C) Temperatura de análisis

La información bibliográfica sobre el efecto de la temperatura de análisis de la muestra de leche sobre el RCS se limita a la referencia de MILLER *et al.* (1986), quienes encuentran, en muestras no preservadas e incubadas a 60° C durante 15 minutos antes del contaje, mayores RCS que a la temperatura habitual de 40° C, probablemente debido a una mayor permeabilidad de la membrana celular al colorante fluorescente (bromuro de etidio) a aquella temperatura.

### D) Efecto de arrastre entre muestras

El efecto de arrastre entre muestras de muy diferentes recuentos presentó el valor del 2%, en leche de vaca (SCHMIDT-MADSEN, 1975), y del 0,5%, en leche de oveja (GONZALO *et al.*, 1993), si bien tales variaciones carecen de importancia desde el punto de vista práctico.

## II.2.3. MÉTODO DE RECUENTO ELECTRÓNICO DE PARTÍCULAS

### II.2.3.1. PRINCIPIO

El método REP se basa en el mismo principio que el recuento automático de hematíes en las preparaciones sanguíneas. Este método está diseñado para contar y clasificar, según su tamaño, las partículas microscópicas que se encuentran en suspensión en un electrolito, mediante el principio de recuento por variación de

## II.2. Métodos directos de recuento celular

---

resistencia eléctrica cuando la dilución de leche es forzada a pasar por un orificio previamente calibrado. Con anterioridad al procesado de la muestra, se hace necesario un profundo desnatado de la leche para evitar la contabilización de los glóbulos grasos (PHIPPS y NEWBOULD, 1966). En efecto, el principal problema estriba en el tratamiento de la muestra de leche con el fin de que las células sean las únicas partículas, dentro del rango de tamaño establecido, que permanezcan en la suspensión. Los glóbulos grasos de la leche presentan un diámetro que oscila entre 1 y 15  $\mu\text{m}$ , solapándose y confundiéndose, por lo tanto, con las células. La eliminación de las partículas grasas puede conseguirse bien por centrifugación, o bien por tratamiento químico. Ambos métodos de preparación para el REP han sido descritos por PHIPPS y NEWBOULD (1966). Actualmente, tras los estudios de PHIPPS (1968) y de PEARSON *et al.* (1970), el método químico, basado en la adición de una mezcla emulsionante electrolítica, resulta preferencial debido a sus mayores ventajas prácticas y económicas y a su superior fidelidad. A título de ejemplo, sobre la base de 17.710 resultados analíticos, este método de recuento explicó el 98,57% de la variación total, mientras que el 1,43% restante fue imputable a errores del método (0,86%) y a la falta de homogeneidad de la distribución celular en la leche (0,57%).

La presencia de bacterias no parece tener consecuencias sobre el RCS final, ya que su tamaño se encuentra por debajo del menor umbral utilizado para el RCS. Cada célula (partícula) de la muestra de leche produce un pulso eléctrico a través del poro de calibrado. El instrumento ofrece directamente el número de células somáticas en miles por mililitro. En la leche de vaca el contador electrónico de células proporciona estimaciones muy precisas y altamente repetibles en un corto período de tiempo. Este método se encuentra en estos momentos perfectamente estandarizado para la leche de vaca en la Norma Internacional 148A (FIL-IDF, 1995).

### II.2.3.2. EQUIPOS DESARROLLADOS

Para la realización del RCS por este procedimiento se han desarrollado varios equipos, entre los que destacan: el contador Coulter modelo ZF<sup>®</sup>, el contador automático Milk Cell Counter<sup>®</sup> (CASADO y GARCÍA, 1986) y el contador Coulter modelo TA<sup>®</sup>, que comentamos brevemente a continuación:

- **Contador Coulter modelo ZF<sup>®</sup>**. Es un contador semiautomático no desarrollado específicamente con este fin, siendo apto también para trabajos de hematología, así como para granulometría de partículas inorgánicas. Permite el recuento y clasificación de cualquier corpúsculo de diámetro comprendido entre 0,5 y 500  $\mu\text{m}$  a una velocidad de hasta 5.000 revoluciones por segundo.
- **Contador Coulter modelo TA<sup>®</sup>**. Ha sido empleado para la identificación de tipos celulares y será comentado más adelante (epígrafe II.5.2).
- **Milk Cell Counter<sup>®</sup>**. Es un aparato totalmente automático, diseñado para el recuento en serie de células somáticas en la leche. Permite diluir, incubar y contar las células que se han preparado utilizando los reactivos estándar Somafix<sup>®</sup> y Somaton<sup>®</sup>. La capacidad del RCS es de 210 muestras por hora. El resultado se presenta en forma digital y puede grabarse directamente en la terminal de un sistema de tratamiento de datos.

### II.2.3.3. FACTORES DE VARIACIÓN

Los factores de variación del método REP participan, en parte, de un carácter de exclusividad derivado del propio principio que sustenta el RCS en este método, de manera que, en vez de núcleos teñidos con colorantes más o menos específicos, como era el caso de los dos métodos anteriores, nos encontramos, en esta ocasión, con partículas de un tamaño predeterminado que deben desplazar su propio volumen al pasar por un orificio situado entre dos electrodos y que compiten en este empeño con glóbulos grasos de un tamaño similar.

#### A) Factores vinculados al procesado de las muestras

En el comienzo de la utilización de este método, y particularmente en el caso de la utilización de la centrifugación para la eliminación de los glóbulos grasos, fueron descritos diversos factores de variación del RCS en función de la velocidad y tiempo de centrifugación de la leche, dilución de la muestra de leche para su centrifugación, temperatura de centrifugación, tratamiento o no con silicona de los

## II.2. Métodos directos de recuento celular

tubos de la centrífuga, modo de redispersión de los depósitos celulares, etc. Actualmente, el método (basado en la dispersión química y térmica de las partículas grasas) está perfectamente estandarizado por la Norma Internacional 148A (FIL-IDF, 1995).

### B) Dilución de la leche en la solución emulsionante

Según esta última técnica, 0,1 ml de la muestra fijada son transferidos a un tubo de ensayo para ser completada hasta 10 ml con la mezcla electrolítica emulsionante, de donde resulta una dilución final entre la muestra y el Somaton<sup>®</sup> del 1:100. No obstante, en caso de muestras de leche alveolar o de repaso, algunos autores incrementan dicha dilución al 1:500 en razón del mayor contenido graso de este tipo de leche (MILLER *et al.*, 1986). Aunque este aspecto resulta de especial interés de cara a la estandarización de la técnica en la leche de oveja, de elevado contenido graso, apenas existen estudios que incidan sobre las posibles diferencias de RCS vinculadas al contenido graso y a la dilución final de la leche en este método (DULIN *et al.*, 1982b).

### C) Edad y almacenamiento de la leche

Una de las principales causas de variación señaladas dentro de este apartado es, a diferencia de los dos métodos anteriores, el incremento gradual del RCS en muestras de leche almacenadas durante 7 días a 4° C, según se aprecia en la Tabla II.4.

Tabla II.4. Variaciones del RCS con la edad de la muestra a 4° C por el método REP, según PHIPPS y NEWBOULD (1966)

Días postordeño	0	1	2	5	7
RCS x 10 <sup>3</sup> /ml	74,1	76,1	77,8	77,3	80,0
DE	5,3	4,9	3,9	3,3	2,5

DE: desviación estándar.

Este incremento gradual, atribuible a una mayor fragmentación celular, es relativamente pequeño (<10%) y coincide con bajas desviaciones estándar que disminuyen, curiosamente, con el paso del tiempo.

#### II.2.4. MÉTODO DEL RECUENTO DE PARTÍCULAS POR ANÁLISIS DE FLUJO CONTINUO

En este método (RPAFC), el RCS es llevado a cabo por un contador óptico de partículas, después de la eliminación de los glóbulos grasos del mismo rango de tamaño que las células somáticas y de la calibración mediante suspensiones de leucocitos de diferentes concentraciones (CASADO y GARCÍA, 1986).

Las células somáticas presentes en la leche se fijan con una solución colorante de formaldehído, que contiene eosina para colorear la muestra fijada. Después de haber mezclado todo adecuadamente, se incuba a temperatura ambiente durante unas veinticuatro horas. La muestra debe analizarse inmediatamente tras la incubación o, en caso contrario, puede conservarse refrigerada (4-8° C) durante un máximo de 48 horas (CASADO y GARCÍA, 1986). Cabe señalar que una fijación rápida es posible, pero solamente en el caso de muestras muy frescas con una contaminación insignificante de bacterias. En este caso concreto, en lugar de la incubación de 24 horas a temperatura ambiente, sería suficiente calentar las muestras en un baño de agua a 55° C durante 45-60 minutos (HEESCHEN, 1975).

Una vez así tratada, la muestra de leche se diluye con una disolución electrolito-emulsionante y se segmenta con burbujas de aire. Tras una mezcla cuidadosa, se vuelve a diluir de nuevo con la citada solución electrolito-emulsionante con el fin de obtener una dilución final de 1:88. Se vuelve a agitar todo y se mantiene en un baño a 80° C durante 10 minutos para conseguir dispersar los glóbulos grasos y desintegrar los agregados celulares. De este modo, el citoplasma de las células es destruido y exclusivamente los núcleos fijados son contados (HEESCHEN, 1975).

Después del calentamiento, la muestra preparada se pasa a través de la cubeta de flujo del contador. El haz luminoso dirigido a la cubeta es dispersado por las partículas presentes y la cantidad de luz dispersada se mide por una fotocélula. La cantidad de luz dispersada es proporcional al número de células somáticas de la leche.

## II.2. Métodos directos de recuento celular

---

El resultado del RCS (en miles por mililitro) es transferido a un registrador o a una impresora.

El RCS por este método se realiza mediante el equipo del sistema Auto-Analyzer II<sup>®</sup>, el cual está constituido por los siguientes módulos colocados en serie: distribuidor de muestras con agitador, bomba suministradora, cartucho analítico, baño caliente, contador de células y registrador. Su capacidad analítica es, aproximadamente, de 60 muestras a la hora (CASADO y GARCÍA, 1986).

### II.2.5. FILTRADO DE ADN A TRAVÉS DE MEMBRANA

El filtrado de ADN es un método colorimétrico para la medición del ADN total de una cantidad determinada de leche (DULIN *et al.*, 1982b).

El procedimiento es relativamente sencillo. Primeramente se mezclan 2,5 ml de la muestra de leche con 20 ml de una disolución en caliente que contiene el detergente Tritón X-100<sup>®</sup> (0,1% v/v), para dispersar los glóbulos grasos, y EDTA (4,5 g/l), para dispersar las micelas de caseína. El conjunto se hace pasar a través de un filtro de membrana de acetato de celulosa de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro, quedando las células somáticas retenidas en dicho filtro. Después de lavar la membrana con 1-2 ml de NaCl al 0,9% con el fin de eliminar las trazas del detergente que pudieran haber quedado y que interferirían con el análisis, se coloca el filtro en un tubo y se añaden 5 ml del reactivo coloreado, cuya composición lleva una parte de HCl 5N, dos partes de agua y una parte de 0,06% de indol. Los tubos se incuban a 90 °C durante 25 minutos, tiempo durante el cual el indol reacciona con la desoxirribosa del ADN hidrolizado para dar lugar a un producto con una absorbancia máxima a 490 nm. Posteriormente se enfrían a temperatura ambiente por inmersión en un baño de agua con el fin de detener dicha reacción. A continuación, se mide la densidad óptica de la disolución en una cubeta de 1 cm de ancho, a esa longitud de onda citada, para determinar la absorbancia de la disolución resultante, de la que habrá que sustraer la correspondiente a un filtro blanco (BREMEL *et al.*, 1977).

Este método requiere equipos relativamente sencillos y puede llevarse a cabo tanto en muestras conservadas como sin conservar (HUTJENS *et al.*, 1970; WARD y SCHULTZ, 1973).

## II.3 MÉTODOS INDIRECTOS DE RECUENTO CELULAR EN LA LECHE

---

### II.3.1. TEST DE WHITESIDE MODIFICADO

Varios autores dieron esta denominación a un método que consistía en la modificación de un experimento que anteriormente se había realizado en 1939. Básicamente dicho método consiste en depositar cinco gotas de leche fría en el centro de una placa de vidrio, añadiéndose, a continuación, una gota de hidróxido sódico al 4%. Se agita vigorosamente la mezcla con una varilla, a la vez que se esparce en forma de mancha circular de aproximadamente 3 cm de diámetro durante unos 20 segundos. En el caso de leche mastítica, se forma una masa viscosa que termina rompiéndose en grumos blancos bañados en un líquido translúcido de fondo. Cuando este test se realiza en leche templada en buenas condiciones de conservación, conviene añadir 2 gotas de hidróxido sódico a las 5 de leche con el fin de obtener mejores resultados. Esta prueba es aplicable a leche de cuarterón, leche completa de ubre y leche de tanque (SCHALM *et al.*, 1971).

Los estudios llevados a cabo sobre la naturaleza de la reacción de Whiteside han demostrado claramente que las células somáticas en buen estado son necesarias para que aquélla tenga lugar. El proceso sucede en dos fases, y en él se encuentran implicadas las células somáticas, como acabamos de señalar, y la grasa. Una explicación que se ha dado como base de la reacción es que el ácido nucleico formaría una sal sódica en presencia del NaOH, originándose una masa gelatinosa sobre la cual serían adsorbidos los sólidos del suero y los glóbulos grasos, apareciendo, entonces, el precipitado característico de la segunda fase. El proceso es gradual y proporcional a la concentración celular, de manera que pueden evidenciarse cinco posibles grados de reacción, en función del espesamiento y coagulación de la

### II.3. Métodos indirectos de recuento celular

---

mezcla (Figura II.3). El calentamiento de la leche o la adición de un conservante, como formalina, cloruro mercuríco o dicromato potásico, anulan la reactividad de la leche mastítica con el hidróxido sódico.

SCHALM y GRAY (1954) compararon el test de Whiteside modificado con el RCS total en leche de vaca. Estos autores afirmaron que los PMN a una concentración de  $200 \times 10^3/\text{ml}$  o más se encontraron en el 3% de las leches con reacción negativa, en el 33% de las leches con reacción traza, en el 87% de las leches con reacción 1+ y en el 98% de las leches con reacción 2+. Con respecto al número total de células somáticas, el 85,1% de las reacciones 1+ y el 99,7% de las 2+ o más intensas se hallaron en muestras de leche con un RCS superior a  $500 \times 10^3/\text{ml}$ .

#### II.3.2. TEST DE CALIFORNIA

El test de California, *California Mastitis Test* (CMT), descrito por SCHALM *et al.* en 1971, se basa en la formación de flóculos por la interacción entre un reactivo y los núcleos celulares. Es una prueba utilizada para el diagnóstico de mastitis subclínicas en la propia explotación y, aunque no es muy precisa, sí puede dar al ganadero una idea bastante aproximada del estado sanitario de las ubres de los animales.

En el reactivo se encuentra un agente surfactante aniónico, generalmente el alquilarilsulfonato, que reacciona con la leche mastítica, dando lugar a una reacción cuya intensidad se puede correlacionar con el número de células somáticas. Esta reacción varía desde un ligero limo, que desaparece con un movimiento continuado, hasta la formación de un persistente gel viscoso. La disolución de alquilarilsulfonato presenta la mayor sensibilidad a pH 7 ó ligeramente superior. Un colorante indicador (púrpura de bromocresol a la concentración de 1:10.000), incorporado al reactivo, cambia hacia un púrpura más profundo a medida que el pH de la leche se incrementa con la mastitis. La reacción del color es especialmente útil para conocer qué cuarterones mamarios han sufrido depresión en su actividad secretora.



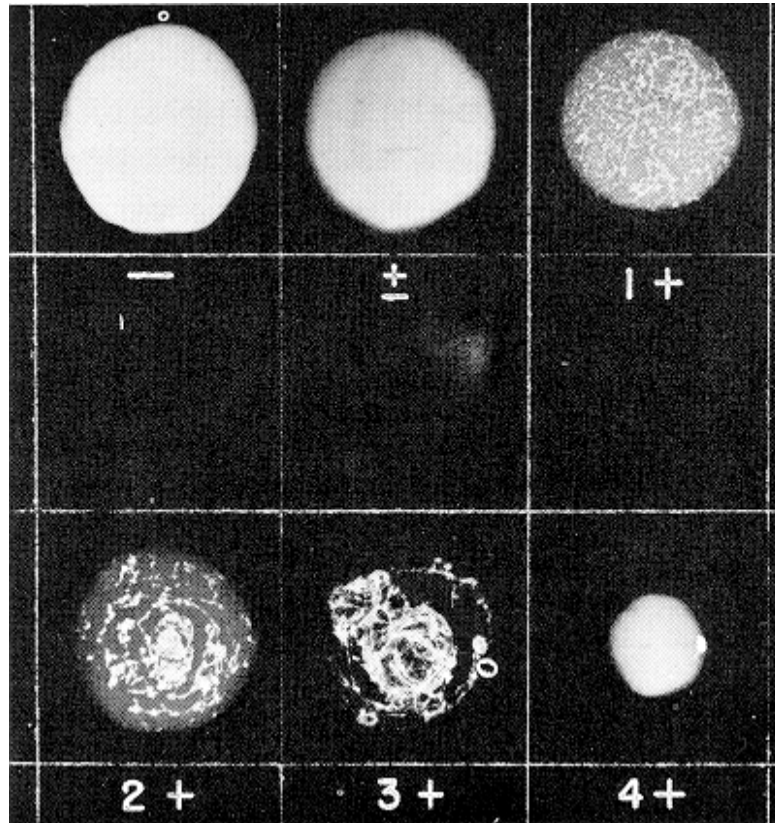


Figura II.3. Grados de reacción al test de Whiteside, según SCHALM y GRAY (1954):

- La mezcla permanece opaca y libre de partículas.
- ± No hay reacción aparente durante la agitación de la mezcla, pero con una inspección más cuidadosa se pudieron apreciar finalmente partículas dispersas.
- 1+ Tiene lugar un espesamiento definido durante la agitación, con una pequeña o nula tendencia de la masa a adherirse a la varilla; si se continúa agitando, la mezcla se separa en suero lácteo y partículas blancas.
- 2+ La mezcla se espesa casi tan pronto como comienza la agitación; el coágulo sigue a la varilla y, finalmente, se separa en un suero claro y en formas blancas y filamentosas.
- 3+ Se forma inmediatamente una masa consistente que se adhiere a la varilla; si se continúa agitando, se separa en el suero y en un material filamentosos, agrupado y opaco.
- 4+ Aparición de un coágulo consistente con pequeña o nula tendencia a descomponerse en suero y material particulado.

### II.3. Métodos indirectos de recuento celular

Para la realización de esta prueba se usan unas paletas de color blanco con 2 (ovejas y cabras) ó 4 (vacas) pocillos, en los cuales se vierten aproximadamente 2 ml de leche y un volumen aproximadamente igual del reactivo. La mezcla se agita suavemente mediante un movimiento circular. La reacción se desarrolla casi inmediatamente cuando se trata de leche con una alta concentración de células somáticas. El punto álgido de la reacción se obtiene en 10 segundos, momento en el que se debe valorar, ya que las reacciones débiles tienden a decolorarse si continúa la agitación. En la Tabla II.5 se puede observar la correspondencia entre el grado de reacción de la prueba y el número de leucocitos PMN en leche de oveja.

Diversas investigaciones desarrolladas para conocer la naturaleza de esta reacción han llegado a la conclusión de que el principio activo que la desencadena en la leche mastítica es el ADN procedente de los núcleos de las células somáticas (CARROLL y SCHALM, 1962), las cuales se rompen por acción del reactivo, con la subsiguiente liberación del ADN.

Tabla II.5. Interpretación del CMT en leche de oveja, según SCHALM *et al.* (1971)

<b>Grado de reacción</b>	<b>Descripción</b>	<b>Rango de PMN (x 10<sup>3</sup>/ml)</b>	<b>Media de PMN (x 10<sup>3</sup>/ml)</b>
Negativa	Sin cambios o con una granulación ligera que desaparece rápidamente	0-310	30
Traza	Limo ligero	0-520	200
1	Limo fuerte	200-2.800	900
2	Limo o gel semilíquido que forma un pico central o que se mueve en masa cuando se agita la paleta	1.144-4.800	2.800
3	Gel fuerte que forma una masa convexa y se adhiere a la parte inferior del pocillo	1.250-17.000	9.500
+	Leche más oscura y alcalina		
++	Color púrpura profundo. Alta alcalinidad y avanzada depresión de la secreción láctea		

Ha habido diversas modificaciones al CMT, como el test de Brabante, el test de Wisconsin y otras, que seguidamente pasamos a comentar.

### II.3.3. TEST DE BRABANTE

Este test ha sido descrito igualmente por SCHALM *et al.* (1971). Fue puesto a punto en leche de vaca en los años 60. Básicamente es un procedimiento automatizado que permite analizar varios miles de muestras de leche por hora.

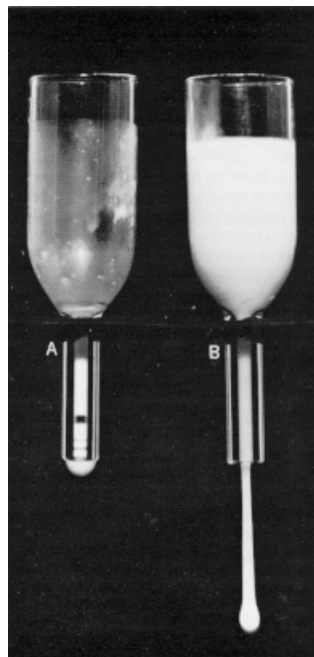


Figura II.4. Embudo usado en el test de Brabante. A = leche normal; B = leche mastítica

Su principio consiste en determinar el tiempo, en segundos, requerido para que un volumen conocido de leche y otro conocido de reactivo (similar al del CMT) fluyan juntos desde un pequeño embudo a través de un tubo capilar de 1,3 mm de diámetro y 2 cm de largo. La viscosidad desarrollada en la leche mastítica provoca

### II.3. Métodos indirectos de recuento celular

una reducción del flujo de la mezcla leche-reactivo por dicho capilar (Figura II.4). En la Tabla II.6 se muestran las equivalencias entre ese tiempo y el número de células.

Tabla II.6. Interpretación del test de Brabante, según SCHALM *et al.* (1971)

Tiempo (segundos)	RCS (x 10 <sup>3</sup> /ml)
< 5	250
5-10	800
> 10	10 <sup>3</sup>

#### II.3.4. TEST DE WISCONSIN

Este método es una modificación del test de Brabante y fue diseñado para leche de tanque. Emplea el mismo reactivo que el CMT, diluido 1:1 con agua destilada. Tiene la ventaja respecto al test de Whiteside y al CMT de que los resultados son medidos de forma objetiva con una regla milimetrada. Los resultados de este método presentan una buena correlación con la raíz cuadrada del RCS llevado a cabo mediante MD (THOMPSON y POSTLE, 1964).

Para la realización del test de Wisconsin se dispone de tubos de plástico de 12,5 x 125 mm, con un orificio lateral a 65 mm de la base y con tapones provistos de un orificio central de 1,15 mm. Estos tubos se disponen en una gradilla de aluminio en dos filas de 10 cada una. Una jeringa automática deposita 2 ml de leche y 2 ml del reactivo en cada uno de dichos tubos. Posteriormente se tapan y se balancean suavemente 10 veces durante 10 segundos para que se produzca la mezcla, manteniéndolos casi en posición horizontal y con el orificio lateral hacia arriba con el fin de que no haya pérdidas de fluido. A continuación, los tubos se dejan en posición vertical durante 20-30 segundos y, pasado este tiempo, se invierte la gradilla con el fin de que salga la mezcla a través del orificio central de los tapones durante 15 segundos. El volumen de fluido que caiga dependerá del grado de viscosidad

resultante de la reacción entre el reactivo y el número de células somáticas presentes en la leche. Al cabo de esos 15 segundos, se vuelve a colocar la gradilla en su posición original y se esperan 2 ó 3 minutos para permitir que se desprenda todo el fluido adherido a las paredes. La altura del fluido que ha quedado en el tubo se expresa en milímetros. Una columna de fluido de menos de 10 mm indicará un RCS considerablemente menor que  $500 \times 10^3$  cél./ml de leche. Una columna de 20 mm implicará un RCS de  $500 \times 10^3$  a  $900 \times 10^3$  cél./ml. Las columnas de más de 20 mm se relacionarán con RCS mayores que  $10^6$  cél./ml (KROGER y JASPER, 1967).

### II.3.5. OTRAS MODIFICACIONES AL TEST DE CALIFORNIA

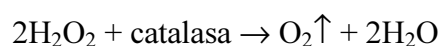
SCHALM *et al.* (1971) han citado las siguientes:

- **Test de Calidad de la Leche.** Esencialmente es igual que el CMT, pero utilizando el colorante AM en lugar de púrpura de bromocresol. Proporciona una reacción idéntica con las células somáticas, pero no evalúa el pH de la leche mediante el cambio de color.
- **Test de Michigan.** El reactivo que lleva es una combinación de detergente y álcali.

### II.3.6. TEST DE LA CATALASA

La catalasa es una enzima que se encuentra en las células de animales y plantas. Si bien su contenido en leche normal es bajo, salvo al comienzo y al final de la lactación, se incrementa de forma evidente en los procesos mastíticos, de tal manera que la medida de su actividad fue uno de los primeros métodos de laboratorio empleados para la determinación indirecta de la concentración de células somáticas en la leche.

El fundamento de esta prueba se basa en que dicha enzima libera oxígeno molecular a partir del peróxido de hidrógeno:



### II.3. Métodos indirectos de recuento celular

El oxígeno libre es recogido en un tubo de fermentación de Smith o en un dispositivo determinado durante un período concreto. Este gas desplazará a un volumen igual de leche, y la cantidad del oxígeno se medirá con una escala graduada o con un gasómetro.

Tabla II.7. Porcentaje de gas y RCS en el test de la catalasa, según SCHALM *et al.* (1971)

<b>O<sub>2</sub>%</b>	<b>RCS ( x 10<sup>3</sup>/ml)</b>
< 20	< 500
20-30	500-1.000
30-40	1.000-2.000
> 40	> 2.000

Cuando se usa un tubo de fermentación de Smith, el brazo vertical del mismo se rellena con una mezcla formada por 5 ml de una disolución al 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 15 ml de leche. Después de una incubación de 3 horas a temperatura ambiente o a 37° C, el volumen de gas acumulado se mide y expresa en porcentaje (Figura II.5).

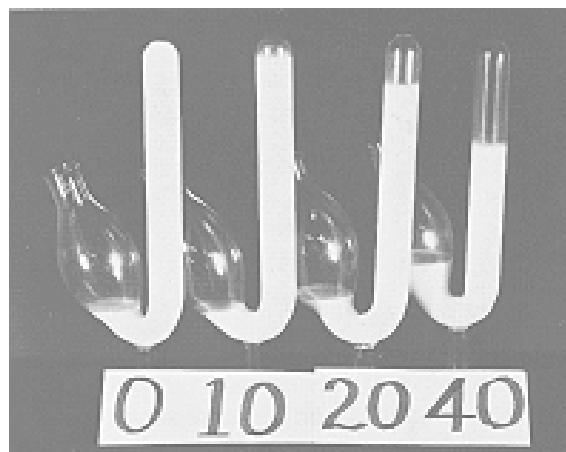


Figura II.5. Test de la catalasa, llevado a cabo en tubos de fermentación de Smith, con un porcentaje de gas que va desde el 0 hasta el 40%

La leche de glándulas normales produce, generalmente, menos de un 10% de gas. Este test puede ser llevado a cabo en un tubo de 20 ml de capacidad, con la abertura cerrada mediante el empleo de un tapón de goma en el que se habrá incrustado previamente un tubo de vidrio doblado en forma de S, a través del cual la leche es desplazada a medida que se acumula el gas. Dicho tubo debe mantenerse en posición vertical durante toda la incubación (SCHALM *et al.*, 1971).

Para la evaluación del test de la catalasa en leche individual de vaca se debería tener en cuenta que, de forma normal, tiene lugar una liberación elevada de gas en los siguientes momentos:

- a) Durante un período variable después del parto.
- b) Cuando hay una baja producción, por cualquier causa, durante la lactación.
- c) Durante la lactación tardía y comienzo de la involución mamaria.

Este test es más adecuado para comprobar la calidad de la leche de tanque que para la leche individual de vaca. Los resultados de su empleo en tanque han llevado a sugerir las relaciones entre el porcentaje de gas y el número de células somáticas por mililitro que figuran en la Tabla II.7.

## II.4. COMPARACIÓN ENTRE MÉTODOS DE RECUESTO CELULAR

---

En un trabajo comparativo de los RCS obtenidos de muestras de leche de vaca de buena calidad higiénica y bacteriológica mediante la aplicación de los métodos MD, FOE y REP, SCHMIDT-MADSEN (1975) encontró, en general, una buena concordancia entre métodos (Tabla II.8), si bien deben reseñarse que los dos electrónicos ofrecieron resultados ligeramente superiores a los del método MD en las muestras de bajos RCS. Igualmente, en las muestras con más de  $1,5-2 \times 10^6$  cél./ml, el método REP tuvo RCS sustancialmente más bajos que el método MD; para este rango de valores, la mayor precisión se obtuvo entre los recuentos MD y FOE.

Tabla II.8. Comparación entre los métodos FOE, MD (factor de trabajo  $10^4$ ) y REP en un total de 674 muestras de leche individual de vaca, según SCHMIDT-MADSEN (1975)

<b>Media (x)</b> (x $10^3$ cél./ml)	<b>Media (y)</b> (x $10^3$ cél./ml)	<b>Coefficiente de correlación</b> $\pm$ ES	<b>Regresión</b> $y = bx + a$
MD (606)	FOE (632)	0,974 $\pm$ 0,0020	$y = 0,924 x + 72.300$
MD (606)	REP (536)	0,955 $\pm$ 0,0034	$y = 0,724 x + 96.500$
REP (536)	FOE (632)	0,981 $\pm$ 0,0015	$y = 1,228 x - 25.200$

ES: error estándar.



La repetibilidad o reproductibilidad de una misma muestra, cuando es contada varias veces con el mismo método, se puede estimar mediante el coeficiente de variación de muestras con diferentes niveles de RCS. En este sentido, la reproductibilidad del método FOE, con coeficientes de variación del 2-5%, resultó comparable a la del REP (2-7%) y considerablemente mejor que la del método MD (7-28%), según los trabajos de HEESCHEN (1975), PEARSON *et al.* (1970) y SCHMIDT-MADSEN (1975).

Los coeficientes de correlación entre métodos ( $r$ ) y, más concretamente, los coeficientes de determinación ( $r^2$ ) nos informan sobre el porcentaje de varianza entre muestras que podrá ser explicada por uno u otro método indistintamente. Así, un coeficiente de correlación de 0,978 entre los métodos REP y FOE significa que el 96% de la variación entre muestras de uno de ellos puede ser explicado por el otro método, o bien que el 4% residual puede ser atribuido a errores de medición (HEESCHEN, 1975). La Tabla II.9 muestra la relación establecida entre los principales métodos de estimación del RCS en leche de vaca, así como la precisión entre los mismos. En conjunto, podemos resumir que los diferentes métodos automatizados de RCS en leche de vaca ofrecen resultados precisos, comparables y repetibles.

Sin embargo, no faltan autores que detectan algunas incongruencias entre los métodos MD y FOE y el método REP de recuento de partículas. En efecto, HILL *et al.* (1982) informan sobre RCS de leche de tanque de un rebaño bovino, significativamente superiores cuando son obtenidos por el método REP que cuando la determinación se realiza por el método FOE o por MD. En dichas muestras fueron encontradas partículas, en forma de esferas colapsadas, formadas por agregados de micelas de caseína de tamaño similar al de las células, y que serían responsables de RCS falsamente elevados (Tabla II.10). Estos autores vinculan la producción de estas partículas a un fenómeno de cavitación de la bomba de vacío. El calentamiento previo de la leche a 55° C durante 15 minutos antes de su fijación hizo desaparecer completamente el problema.

WRIGHT y PEARSON (1969) encontraron una buena correlación entre la MD y el REP ( $r = 0,944-0,978$ ), semejante a la señalada por PEARSON *et al.* en 1970 ( $r = 0,930-0,966$ ). Estos mismos autores, comparando el CMT y el test de Brabante con el REP, obtuvieron unos coeficientes de correlación de 0,817, para el primero, y de 0,987, para el segundo.

#### II.4 Comparación entre métodos

Tabla II.9. Coeficientes de correlación entre los métodos MD, REP, RPAFC y FOE en la leche de vaca (n = 88), según HEESCHEN (1975)

Método	Réplica	MD		FOE		RPAFC		REP	Media geométrica
		2	1	2	1	2	1	2	(x 10 <sup>3</sup> /ml)
REP	1	0,955	0,955	0,978	0,979	0,979	0,979	0,992	184
	2	0,949	0,955	0,978	0,981	0,977	0,977		180
RPAFC	1	0,971	0,966	0,985	0,986	0,993			180
	2	0,969	0,967	0,988	0,988				184
FOE	1	0,970	0,962	0,995					138
	2	0,962	0,965						137
MD	1	0,949							144
	2								167

Tabla II.10. RCS (x 10<sup>3</sup>/ml) obtenidos por diferentes métodos en 4 muestras de leche recogidas en una granja de ganado vacuno lechero (HILL *et al.*, 1982)

Método de recuento	Muestra				
	1	2	3	4a	4b
REP (fijación normal con formalina)	637	830	687	929	166
REP (leche calentada a 55°C antes de la fijación)	105	304	179	153	158
MD	70	400	205	190	ND
Método FOE	ND	317	172	ND	ND

4a: leche normal de tanque; 4b: leche de mezcla de primeros chorros de leche evitando la máquina de ordeño; ND: no disponible.

En otro trabajo realizado también en leche de vaca (MILLER *et al.*, 1986), fueron comparados los métodos FOE y REP, hallándose que este último daba lugar a RCS más elevados que el FOE tanto para la leche cisternal como para la leche de repaso, aunque sólo hubo diferencias significativas en la leche de repaso (700.521 *versus* 570.033 cél./ml). Ello es interesante porque es, en este punto, donde el REP encuentra su limitación. En efecto, debido a que el RCS llevado a cabo mediante el método REP no es ADN-específico, los elevados valores encontrados son causados, probablemente, por el recuento de fragmentos celulares y agregados proteicos de la leche final del ordeño.

POULTREL y LERONDELLE (1983) encontraron unos valores medios del RCS en leche de cabras con glándulas no infectadas mucho más elevados ( $1.404 \times 10^3$  cél./ml) cuando se estimaron con el método REP que cuando fueron analizados por el método FOE ( $614 \times 10^3$  cél./ml), lo que evidencia la inadecuación del método REP a la leche de esta especie. Adicionalmente, estos autores encontraron coeficientes de correlación de 0,74, 0,71 y 0,65 entre los métodos REP y FOE, CMT y FOE, y CMT y REP, respectivamente.

En la leche de esta misma especie, DULIN *et al.* (1982b) comparan varios de los métodos que son usados rutinariamente para la estimación del RCS en leche de vaca, con el fin de determinar cuáles de ellos son los más precisos para el RCS de aquella especie (Tabla II.11), concluyendo que no hay diferencias significativas entre el filtrado de ADN, la MD con PVM y el método FOE, todos ellos específicos de ADN. El Test de Wisconsin, que también es ADN-específico, no difiere significativamente del método FOE. El resto de métodos proporciona valores significativamente más elevados.

En la leche de oveja, estudios recientes demuestran que el método FOE presenta una adecuada precisión y repetibilidad cuando es contrastado con el método MD con una tinción específica de células sanguíneas, como es la MGG. El coeficiente de correlación del logaritmo del RCS entre ambos métodos fue de 0,986. La repetibilidad o reproductibilidad del método FOE en la leche de oveja varió desde el 2,8%, para RCS de  $12.100 \times 10^3$  cél./ml, hasta el 10,0%, para RCS de  $46 \times 10^3$  cél./ml (GONZALO *et al.*, 1993).

En la leche de esta misma especie, algunos autores han comparado el método REP, bien con el método MD (KEISLER *et al.*, 1992; ROGUINSKY, 1974), o bien con el

#### II.4 Comparación entre métodos

FOE (GREEN, 1984). Los coeficientes de correlación obtenidos entre métodos fueron altos (de 0,910 a 0,997).

Tabla II.11. Comparación de métodos de estimación de células somáticas en leche de cabra (DULIN *et al.*, 1982b)

<b>Método</b>	<b>RCS (x 10<sup>3</sup>/ml)</b>
<b>Filtrado de ADN</b>	303 <sup>a</sup>
<b>MD con PVM, células solamente</b>	340 <sup>a</sup>
<b>Método FOE</b>	365 <sup>ab</sup>
<b>Test de Winconsin</b>	494 <sup>bc</sup>
<b>Método REP, dilución 1:500</b>	644 <sup>cd</sup>
<b>Método REP, dilución 1:100</b>	675 <sup>cd</sup>
<b>MD con la tinción de Levowitz-Weber</b>	792 <sup>d</sup>
<b>MD con PVM, células + PC</b>	887 <sup>d</sup>

<sup>a,b,c</sup>Medias con las mismas letras no difieren para  $p < 0,05$ .

Sin embargo, todos estos estudios no aportan informaciones adicionales que sean de interés de cara a la validez del método REP sobre la repetibilidad del mismo, ni sobre el grado de precisión de las medias de RCS obtenidas por los diferentes métodos, ni tampoco sobre la línea de regresión, por lo que esta información inconcluyente impide un pronunciamiento favorable sobre la definitiva validez del método REP en la leche de oveja.

## II.5. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE LOS TIPOS CELULARES

---

El recuento diferencial de células somáticas en la leche constituye una herramienta diagnóstica esencial en la investigación de la mastitis en el ganado bovino (DULIN *et al.*, 1982a), de ahí que durante cierto tiempo, o por determinados autores, hayan tenido interés, y lo sigan teniendo, los procedimientos que permiten obtener la fórmula celular de la leche.

### II.5.1. MÉTODO MICROSCÓPICO

El método MD de identificación celular resulta el más adecuado para diferenciar los diferentes tipos o categorías celulares sobre la base de criterios morfológicos y afinidades tintoriales de las mismas (DULIN *et al.*, 1982a; GONZALO y GAUDIOSO, 1985; GONZALO *et al.*, 1988; SCHALM *et al.*, 1971; THIEULIN y VUILLAUME, 1967).

En este sentido, DULIN *et al.* (1982a) indicaron que el método de la extensión directa es similar a la técnica empleada en sangre. Para llevarla a cabo, se deposita una gota de leche y otra de tripticasa-caldo de soja (TSB), que facilita la adherencia de las células al portaobjetos, en el extremo de un portaobjetos limpio. La mezcla se extiende uniformemente sobre la superficie mediante un cubreobjetos con un ángulo de aproximado de 30°. Esta película se deja secar al aire y, posteriormente, se tiñe con un colorante de Wright modificado.

Sin embargo, estos mismos autores afirmaron que esta técnica presenta algunos problemas, como una distribución de leucocitos desigual. Así, las células grandes, particularmente los PMN, se concentrarán en las márgenes, mientras que los

## II.5. Métodos de identificación de los tipos celulares

linfocitos permanecerán principalmente en la porción central de la película. Por otra parte, tanto la morfología como la capacidad tintorial de los leucocitos podrían verse alteradas durante la realización de la extensión debido a daño o lisis celular y a interferencias de los glóbulos grasos con el colorante. Además de todo ello, cuando se preparan extensiones directas a partir de leche procedente de glándulas no infectadas, con RCS bajos (menos de  $200 \times 10^3$  cél./ml), resulta difícil encontrar suficientes células para proceder a un RCS diferencial exacto (SCHALM *et al.*, 1971).

Por estas razones, DULIN *et al.* (1982a) señalan la conveniencia de utilizar la técnica de la centrifuga *cytospin*, que ha sido adaptada a estudios de células en diversos fluidos biológicos. Esta técnica da lugar a una distribución uniforme de las células sobre un área circular de 6 mm de diámetro sobre el portaobjetos y con escasa lisis celular. La densidad de la suspensión de células también se puede incrementar para muestras que contengan un bajo RCS.

Para realizar el recuento diferencial por el método de la centrifuga *cytospin*, se añaden 8 ml de tampón fosfato salino (PBS) y 1 ml de leche a un tubo, que se centrifuga a  $180 \times g$  durante 10 minutos a  $5^\circ \text{C}$ ; después, se elimina el sobrenadante, dejando 0,5 ml del mismo. Con un bastoncillo de algodón se limpian los restos de grasa que hayan quedado adheridos a las paredes. A los tubos que no presenten un sedimento visible se les añadirán 0,2 ml de TSB; a aquéllos en los que dicho sedimento sea evidente se les añadirán 2 ml de PBS y 0,2 ml de TSB. A continuación, el sedimento se resuspende y se toman 0,2 ml, los cuales se depositan en la cámara *cytospin*, donde se centrifugan durante 10 minutos a  $225 \times g$ . Con posterioridad y una vez que la película se haya secado al aire, se tiñe del mismo modo que por el procedimiento de extensión directa (DULIN *et al.*, 1982a).

La técnica de la centrifuga *cytospin* es particularmente útil para el recuento diferencial de muestras con bajo RCS. Además, la concentración de células somáticas lograda mediante este método ahorra un tiempo considerable a la hora de llevar a cabo dicho recuento diferencial (DULIN *et al.*, 1982a).

### II.5.2. MÉTODO DE RECUESTO ELECTRÓNICO DE PARTÍCULAS

Algunos autores preconizan la utilización de una adaptación del método REP, como sucede en el contador Coulter modelo TA<sup>®</sup> o “canalizador”, que permite

clasificar los diversos tipos celulares en 16 grupos o canales en función de su volumen celular, posibilitando la realización de histogramas de frecuencias celulares (Figura II.6).

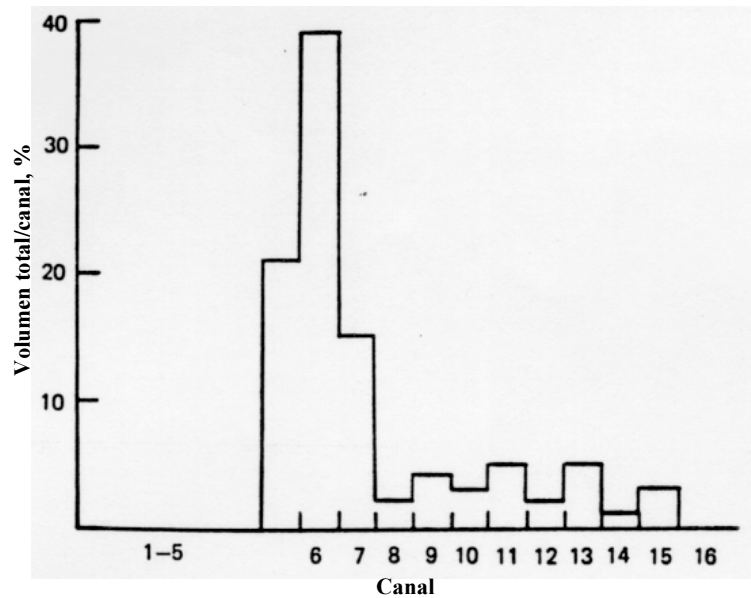


Figura II.6. Histograma mostrando una distribución del volumen celular

La imagen de estos histogramas resulta diferente para las muestras procedentes de las mamas sanas y de las infectadas, como consecuencia de los cambios celulares ocurridos durante la inflamación. Este método se ha utilizado tanto en leche de vaca (HOARE *et al.*, 1980) como de cabra (SHELDRAKE *et al.*, 1981; SMITH y ROGUINSKY, 1977). En leche de vaca, HOARE *et al.* (1982) indican que este método permite identificar a las partículas no-celulares como tales, evitando así los RCS falsamente elevados obtenidos por el método REP simple. En cabra, y para un barrido de 5 a 180  $\mu\text{m}^3$  de volumen de partículas, se observa una mayor frecuencia de distribución celular entre 65 y 100  $\mu\text{m}^3$  en la leche de mamas infectadas, mientras que las glándulas sanas presentan un volumen celular menor de 50  $\mu\text{m}^3$ . Sin embargo, esta técnica tiene algunos inconvenientes importantes, como son la existencia de solapamientos de diferentes tipos celulares de igual tamaño, así como su discreto

### 11.5. Métodos de identificación de los tipos celulares

---

valor predictivo del estado de infección de la mama, circunstancias que limitan la aplicación de este método de identificación y valoración de los diferentes tipos celulares.

El recuento paralelo del número total de células por mililitro, por cualquiera de las técnicas descritas con anterioridad (MD, REP o FOE), permitiría determinar la concentración específica de cada tipo celular.



## II.6. CONTROL DE CALIDAD

---

Ya hemos visto la importancia que, sobre el RCS, tienen los factores de variación analíticos y de conservación en cada uno de los diferentes métodos de RCS. Sin embargo, la estandarización del RCS no afecta únicamente a los procesos de preparación y procesado analítico de la muestra, sino también a la calibración, evaluación y ajuste del propio aparato utilizado para su determinación. El objetivo de los procedimientos de control de calidad consiste en garantizar la mejor adecuación posible entre la variable analizada por el método laboratorial rutinario y el método de referencia o valor real de una muestra concreta. La inadecuación puede ser debida a errores fortuitos ocurridos en el momento de las determinaciones individuales, o bien a errores sistemáticos o acumulados debidos, por ejemplo, a una calibración incorrecta de los instrumentos de medida. En función de su ámbito de actuación, el control de calidad puede ser intra o interlaboratorios, según sean uno o varios los laboratorios implicados en el mismo.

La necesidad de garantizar la precisión y homogeneidad de resultados entre laboratorios constituye el objetivo principal de la Norma Internacional 135B (FIL-IDF, 1991), sobre las características de fidelidad de los métodos analíticos, el diseño de un protocolo de acción en los estudios de colaboración entre laboratorios y los análisis estadísticos sobre la variabilidad de los resultados de análisis tanto en cada laboratorio (repetibilidad) como entre laboratorios (reproductibilidad). En este sentido, el control de calidad de los métodos e instrumentos de RCS constituye un interesante y necesario apartado con vistas a evaluar los rendimientos relativos de cada método, dentro del propio laboratorio y en ensayos comparativos entre diferentes laboratorios, tal y como señala la Norma Internacional 148A (FIL-IDF, 1995), específicamente para la variable que estamos comentando.

### II.6.1. TESTS COMPARATIVOS

Por lo que respecta a dichos ensayos comparativos, éstos se vienen realizando actualmente de forma periódica entre los laboratorios interesados, si bien el primer test comparativo realizado en Europa data de 1975 y fue organizado por HEESCHEN. Este autor fue el primero en señalar la necesidad de estandarizar los procedimientos de RCS mediante la realización de un control de calidad estadístico basado en patrones de referencia de RCS conocido y, al mismo tiempo, en tests comparativos. Mediante la utilización de suspensiones estándar de partículas (células), el primer test comparativo fue realizado entre 12 laboratorios de seis países europeos. Todos los laboratorios participantes recibieron suspensiones patrón de células con contenidos extremadamente bajos, medios y altos en orden a estandarizar su procedimiento de RCS. El número de preparaciones independientes distribuidas entre los laboratorios fue de 10, las cuales fueron enviadas por duplicado y contadas, asimismo, por duplicado por los procedimientos electrónicos de cada laboratorio. El método MD sirvió como referencia. Para una media geométrica de  $378 \times 10^3$  cél./ml, los resultados pueden resumirse de la siguiente forma: la desviación entre muestras duplicadas fue del 6,5%; las preparaciones independientes mostraron una desviación del 7%; la desviación entre los RCS duplicados osciló en torno al 5,5%; la desviación entre las medias geométricas de cada laboratorio y la media geométrica del laboratorio de referencia fue del 1,5%. Finalmente, la desviación entre la media geométrica de todos los RCS de los laboratorios participantes y la media geométrica de los RCS efectuados por el método MD de referencia fue del 1,4% (por ejemplo: una desviación absoluta de 5.222 cél./ml para un valor medio de  $378 \times 10^3$  cél./ml).

En los momentos actuales, dicho autor sigue informando de los resultados de los tests comparativos entre laboratorios en materia de RCS de leche de vaca (HEESCHEN, 1994).

### II.6.2. PATRONES DE REFERENCIA DE RECuento CONOCIDO

La realización de tests comparativos pone claramente de manifiesto que la utilización de patrones estándar ha producido un considerable incremento de la fiabilidad de los resultados entre los laboratorios y el recuento MD. En efecto, si bien

el método MD constituye siempre el método de referencia con el que contrastar cualquier procedimiento electrónico, sería muy útil poder disponer de patrones de RCS conocido para la evaluación y estandarización de todo el proceso de recuento, cualquiera que sea el aparato utilizado. Actualmente se vienen utilizando patrones estándar de referencia para el RCS en leche de vaca, que cubren la gama comprendida entre  $200$  y  $800 \times 10^3$  cél./ml. Tales patrones son usados ampliamente para la realización de controles rutinarios en los laboratorios de RCS, así como en ensayos comparativos entre laboratorios (HEESCHEN, 1975; HEESCHEN, 1994). Igualmente, se han venido estudiando distintas formas de preparación de los mismos, que aseguren al máximo su estabilidad (VERMUNT *et al.*, 1995). Sin embargo, y aunque tales patrones de referencia pueden ser utilizados por los laboratorios dedicados al RCS de la leche de oveja y cabra, desde nuestro punto de vista debería ser posible el uso de muestras de referencia elaboradas específicamente a partir de la leche de estas especies. Un aspecto adicional viene derivado de la elevada respuesta celular desarrollada en estas especies frente a las infecciones subclínicas, por lo que sería deseable, además, cubrir un rango más amplio que el anteriormente citado para la leche de vaca.

### II.6.3. ENSAYOS ENTRE LABORATORIOS DE ANÁLISIS DE LECHE DE OVEJA Y CABRA

En el momento actual, y dentro del Proyecto Europeo de Investigación FAIR 1 CT 95-0881 (titulado: *Estrategias de control en granja del recuento de células somáticas en leche de oveja y cabra*), nuestro grupo de investigación participa en un ensayo comparativo que incluye a más de 33 laboratorios europeos, entre adscritos y no adscritos a dicho Proyecto. Los resultados parciales, tras un año de envío sistemático de patrones de referencia y de muestras problema, son, en cierta forma, sorprendentes, pues son relativamente pocos los laboratorios que cumplen estrictamente los requisitos exigidos por las normas internacionales en cuanto a precisión y repetibilidad de sus aparatos. Una de las consecuencias más directas que se puede extraer de lo anteriormente comentado es la obligada utilización rutinaria de patrones de concentración conocida, la cual resulta indispensable para garantizar la calidad analítica de los laboratorios. En efecto, hasta el momento presente el servicio

## II.6. Control de calidad

---

técnico de los aparatos de recuento automatizado no dispone de patrones de referencia válidos, lo que impide garantizar una auténtica calidad de servicio, al desconocerse el grado de precisión alcanzado tras la revisión o reparación efectuada.

Cada laboratorio participante recibe 10 muestras problema para un rango comprendido entre  $50 \times 10^3$  y  $1.800 \times 10^3$  cél./ml, que son analizadas por duplicado, remitiendo los resultados al laboratorio coordinador. Tras el análisis estadístico de los mismos, la información enviada por el laboratorio coordinador a cada laboratorio participante, en cada uno de los ensayos, es básicamente la siguiente:

- Clasificación cualitativa de los laboratorios en función de la evaluación individual de los mismos.
- Repetibilidad o desviaciones entre réplicas de los laboratorios.
- Medias de las réplicas de cada laboratorio.
- Desviación entre las medias de los laboratorios y los patrones de referencia (precisión).
- Evaluación de la calibración mediante regresión lineal.
- Evaluación individual de los laboratorios.
- Histogramas de:
  - \* Repetibilidad de los laboratorios.
  - \* Repetibilidad del método para todos los laboratorios y muestras.
  - \* Distribución de los errores sistemáticos de los laboratorios.

Esta información permite evaluar rigurosamente el rendimiento del laboratorio de RCS, a la vez que detectar posibles anomalías de los aparatos utilizados, que deberán ser corregidas para garantizar la calidad analítica y la reproductibilidad y precisión de los resultados, lo cual resulta indispensable para cualquier laboratorio de investigación o de control lechero.

### III. MATERIAL Y MÉTODOS



### III.1. EXPERIENCIA I:

Comparación de los métodos microscópico y fluoro-opto-electrónico de recuento de células somáticas y estudio de la influencia de las condiciones de conservación, temperatura de almacenamiento, edad de la muestra y temperatura de análisis sobre el método fluoro-opto-electrónico en la leche de oveja

---

#### III.1.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Un total de 80 muestras individuales de 250 ml de leche de oveja, con un amplio rango de RCS que varió desde  $10 \times 10^3$  hasta  $20 \times 10^6$  cél./ml, fueron recogidas de ovejas procedentes de explotaciones próximas a la Facultad de Veterinaria de León y transportadas inmediatamente al laboratorio de control lechero del Departamento de Producción Animal I de dicha Universidad.

Después de reservar, por cada muestra, una alícuota de 3 ml para el análisis por MD, cada una de las 80 muestras se dividió en 80 alícuotas de 3 ml cada una, subdivididas en 4 grupos de 20, en función del conservante utilizado:

- A 20 no se les añadió conservante.
- A 20 se les añadió dicromato potásico (Panreac<sup>®</sup>) a una concentración de 0,1 g/100 ml de leche.
- A 20 se les añadió azidiol<sup>1</sup> hasta obtener una concentración final de azida sódica en leche de 0,024 g/100 ml.

---

<sup>1</sup>Preparación del conservante azidiol: se disolvieron 1,5 g de cloranfenicol (Merck<sup>®</sup>) en 10 ml de etanol (Merck<sup>®</sup>). A dicha disolución se añadieron 600 ml de agua desionizada y, a continuación, 36 g de azida sódica (Merck<sup>®</sup>). Para estabilizar el valor de pH se adicionaron 45 g de citrato trisódico-5,5-hidrato (Merck<sup>®</sup>). Se mantuvo en agitación en baño María a 50° C hasta la perfecta disolución de los reactivos. Por último, se añadieron 0,35 g de azul de bromofenol (Merck<sup>®</sup>), completando la disolución total con agua desionizada hasta enrasar a 1.000 ml. Una agitación final permitió la completa preparación del conservante.

- A las 20 restantes se les añadió bronopol (2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol) (Sigma®) a una concentración de 0,05 g/100 ml de leche.

A su vez, en cada grupo de 20 alícuotas, 10 fueron conservadas a temperatura ambiente, y las otras 10, a temperatura de refrigeración (4° C). En cada lote de 10, cada una de las alícuotas se correspondió con cada una de las 10 edades analíticas siguientes: 3 horas, 6 horas, 12 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 7 días y 9 días posrecogida. Para cada una de estas edades, tanto las alícuotas conservadas a temperatura ambiente como las mantenidas en refrigeración fueron analizadas por duplicado, tanto a 40° como a 60° C, por el método FOE (Tabla III.1).

Las 80 alícuotas inicialmente reservadas se analizaron por el método MD dentro de las 6 horas posrecogida. Para ello, en tres portaobjetos se realizaron 6 extensiones de 0,01 ml de leche cada una (2 por cada portaobjetos), de las que dos se tiñeron con AM; otras dos, con MGG, y las dos restantes, con la tinción PVM, siguiendo la metodología analítica que se describe a continuación.

#### III.1.2. METODOLOGÍA ANALÍTICA

##### III.1.2.1. RECUENTO DE CÉLULAS SOMÁTICAS MEDIANTE EL MÉTODO MICROSCÓPICO DIRECTO

Tanto para la preparación de las películas de leche como para realizar el RCS, se siguieron los procedimientos oficiales recomendados por la Norma Internacional 148A (FIL-IDF, 1995), ligeramente modificados y adaptados a la leche de oveja, de la manera que se detalla a continuación.

##### A) Extensión y tinción de las muestras

Dentro de las 6 horas siguientes a su recogida, cada muestra de leche se calentó en un baño María a 40° C y posteriormente se agitó cuidadosamente hasta que se enfrió a temperatura ambiente. Para cada extensión se tomaron 0,01 ml con una microjeringa Hamilton® (Microliter™ Syringes) de 25 µl de capacidad y con un 2% de tolerancia máxima a 20° C. Este volumen exacto de leche se depositó con sumo cuidado sobre una superficie de 1 cm<sup>2</sup> (20 mm x 5 mm), previamente dibujada sobre



**Tabla III.1. Diseño experimental.**

**80 ovejas muestreadas (250 ml)**

**80 alícuotas/muestra (3 ml)**

<b>Conservación</b>	<b>Almacenamiento</b>	<b>Edad</b>	<b>T<sup>a</sup> análisis</b>
20 sin conservante	10 a T <sup>a</sup> ambiente (20° C)	3h, 6h, 12h, <b>24h</b> , 2d, 3d, 4d, 5d, 7d y 9d postordeño	40° y 60° C
	10 a T <sup>a</sup> refrigeración (4° C)	3h, 6h, 12h, <b>24h</b> , 2d, 3d, 4d, 5d, 7d y 9d postordeño	40° y 60° C
	10 a T <sup>a</sup> ambiente (20° C)	3h, 6h, 12h, <b>24h</b> , 2d, 3d, 4d, 5d, 7d y 9d postordeño	40° y 60° C
20 con dicromato potásico	10 a T <sup>a</sup> refrigeración (4° C)	3h, 6h, 12h, <b>24h</b> , 2d, 3d, 4d, 5d, 7d y 9d postordeño	40° y 60° C
	10 a T <sup>a</sup> ambiente (20° C)	3h, 6h, 12h, <b>24h</b> , 2d, 3d, 4d, 5d, 7d y 9d postordeño	40° y 60° C
20 con azidiol	10 a T <sup>a</sup> refrigeración (4° C)	3h, 6h, 12h, <b>24h</b> , 2d, 3d, 4d, 5d, 7d y 9d postordeño	40° y 60° C
	10 a T <sup>a</sup> ambiente (20° C)	3h, 6h, 12h, <b>24h</b> , 2d, 3d, 4d, 5d, 7d y 9d postordeño	40° y 60° C
20 con bronopol	10 a T <sup>a</sup> refrigeración (4° C)	3h, 6h, 12h, <b>24h</b> , 2d, 3d, 4d, 5d, 7d y 9d postordeño	40° y 60° C

**80 ovejas x 80 alícuotas x 2 temperaturas de análisis x 2 réplicas = 25.600 observaciones. d: días; h: horas; T<sup>a</sup>: temperatura.**

un portaobjetos Poly-Prep™ de Sigma Diagnostics®, tratado con poli-L-lisina para incrementar la adherencia de la película de leche. La leche se extendió con un asa acodada de forma que quedara toda la superficie cubierta, ajustándonos a los límites del rectángulo. Se dejó secar al aire durante toda la noche, resguardándola del polvo, y, transcurrido ese tiempo, se procedió a la tinción de las extensiones, siguiendo los protocolos que se incluyen más adelante.

#### B) Calibración del microscopio

El diámetro del campo microscópico se midió mediante un portaobjetos graduado micrométricamente, resultando ser de 0,185 mm. Esto nos permitió conocer el área de cada campo, el número de campos en la superficie de 1 cm<sup>2</sup> (100 mm<sup>2</sup>), el número de células en los 0,01 ml de la extensión de leche y, en consecuencia, el número total de células por mililitro de leche, según la siguiente fórmula:

$$RCS(\text{células/ml}) = \frac{10^4 x}{\pi r^2}$$

siendo  $r$  el radio, en milímetros, de un campo microscópico de inmersión, y  $x$ , el número medio de células por campo.

El cociente  $10^4/\pi r^2$  resultó ser de 372.019, por lo que una media de una célula por campo equivaldrá a 372.019 células por cada mililitro de leche. Este valor se denomina *factor del microscopio*. Dividiendo este factor entre el número medio de campos contados en cada extensión, que en nuestro caso fue de 165, obtenemos el *factor de trabajo*, que fue de 2.255.

#### C) Proceso de recuento celular

En cada una de las seis películas de leche se contaron todos los campos existentes en 7 bandas verticales distribuidas de forma homogénea a lo largo de toda la extensión, tal y como recomienda la Norma Internacional 148A (FIL-IDF, 1995).

En cada campo se estimó el RCS diferencial entre células somáticas (núcleos teñidos) y PC, sin tener en cuenta aquellas células o PC que quedaran en los límites del campo y que sobresalieran menos del 50% de su volumen. Por cada tinción, por lo tanto, conseguimos 2 valores de RCS y 2 valores de recuento de PC. Los criterios empleados para la diferenciación entre células y PC son comentados dentro de cada tinción.

#### **D) Tinciones empleadas**

Como ya se ha señalado con anterioridad, para la realización de esta experiencia se han utilizado tres tinciones distintas:

##### **Azul de metileno**

Es la solución colorante oficial según la Norma Internacional 148A (FIL-IDF, 1995). Su preparación se llevó a cabo del siguiente modo: se mezclaron 54 ml de alcohol etílico (Prolabo<sup>®</sup>) al 95% (v/v) y 40 ml de 1,1,1-tricloroetano (Panreac<sup>®</sup>) en un recipiente que se calentó, a continuación, en un baño María a 60-70 °C. Una vez que la mezcla había alcanzado esta temperatura, se añadieron cuidadosamente 0,6 gramos de AM (Panreac<sup>®</sup>), verificando que su distribución en la solución fuera uniforme. Se enfriaron en un refrigerador a 4 °C y, una vez conseguida esta temperatura, se añadieron 6 ml de ácido acético glacial (Panreac<sup>®</sup>). A continuación, se filtró la solución con un filtro de no más de 10-12 µm de diámetro de poro y se almacenó el colorante en un recipiente herméticamente cerrado. Esta solución se filtró de nuevo cada vez que fue utilizada.

El protocolo de tinción seguido con este colorante fue el siguiente:

- Se cubrieron las extensiones con la solución colorante, indicada anteriormente, durante 10 minutos.
- Se eliminó el colorante.
- Se dejó secar al aire durante otros 10 minutos.
- Se lavó suavemente con agua de grifo hasta la eliminación del exceso de colorante, procurando que no se levantara la película de leche.
- Se volvió a dejar secar al aire.

- Se montó la preparación con Entellan<sup>®</sup> (Merck<sup>®</sup>), realizando el recuento de células y PC con el objetivo de inmersión.

El criterio empleado para realizar la diferenciación entre células y PC fue el siguiente: los núcleos celulares se tiñeron de un color azul oscuro (BURCK, 1969), mientras que los citoplasmas, que prácticamente sólo se pudieron observar en los macrófagos, lo hicieron de un color azul más tenue (Figura III.1). Finalmente, se consideraron como PC aquellas estructuras anucleadas teñidas de igual forma que los citoplasmas, pero con forma de capuchón o casquete y de tamaño similar al de las células (Figura III.2). Las PC de pequeño tamaño no fueron contadas.

#### **May-Grünwald-Giemsa**

Esta técnica, también denominada *coloración panóptica de Pappenheim* (BURCK, 1969), fue descrita por primera vez para leche de oveja por GONZALO y GAUDIOSO (1983), si bien con posterioridad ha sido ligeramente modificada tal y como se expone a continuación:

- Fijación de las extensiones en alcohol etílico de 96° durante 3 minutos.
- Eliminación del alcohol y secado al aire.
- Desengrasado con xilol (Panreac<sup>®</sup>) durante 8 minutos y, transcurrido ese tiempo, lavado con alcohol etílico de 60°.
- Secado al aire.
- Tinción con el colorante May-Grünwald (Merck<sup>®</sup>) puro durante 2 minutos.
- Tinción con una solución al 50% en agua desionizada del mismo colorante durante 2 minutos, después de eliminar el colorante anterior.
- Eliminación, de forma incompleta, del colorante y tinción, a continuación, con una solución de Giemsa (Merck<sup>®</sup>) en agua desionizada (14 gotas del colorante en 10 ml de agua desionizada), preparada en el momento, durante 20 minutos.
- Lavado ligero con agua de grifo y secado al aire.
- Por último, montaje de la preparación con Entellan<sup>®</sup>, llevándose a cabo el RCS con el objetivo de inmersión.

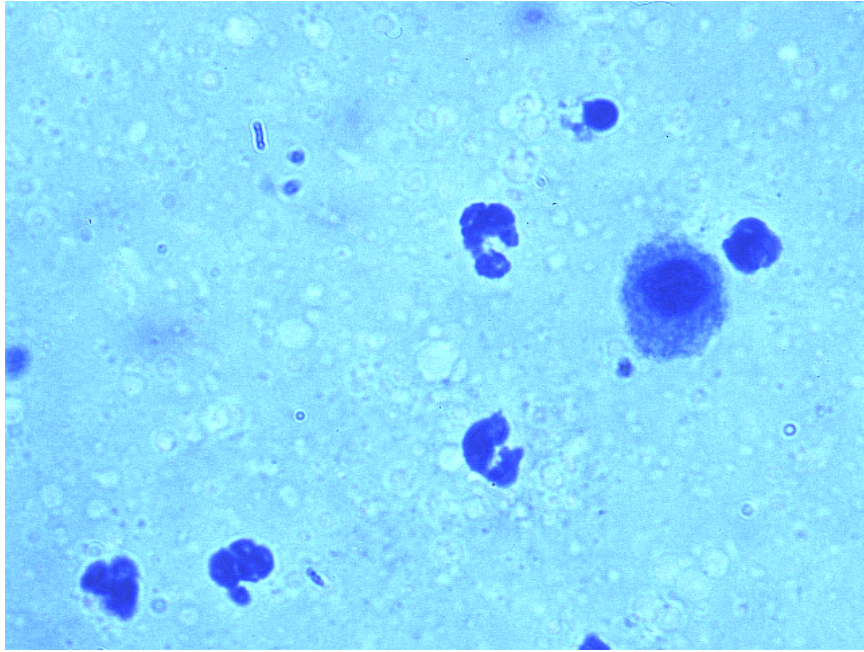


Figura III.1. Tinción azul de metileno: células somáticas

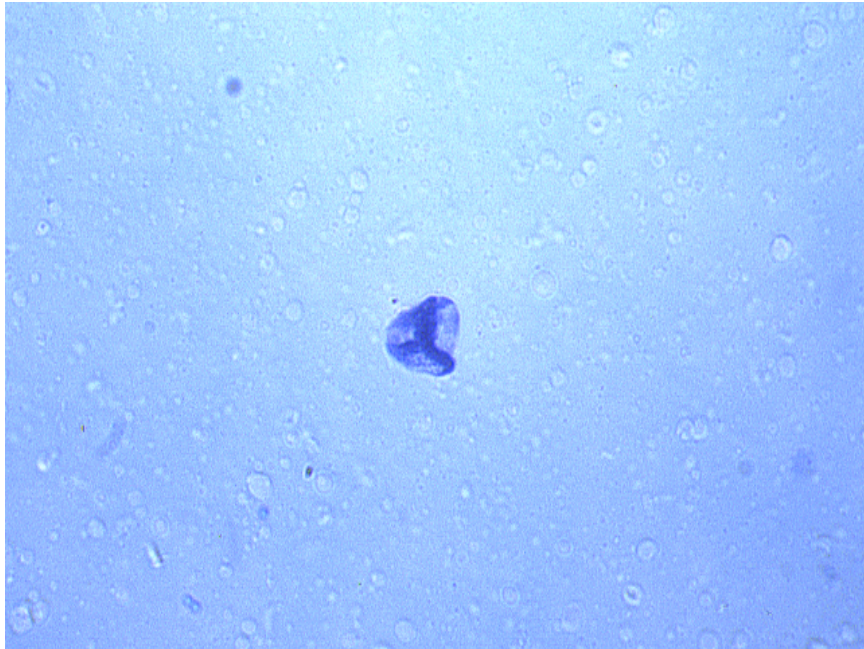


Figura III.2. Tinción azul de metileno: partícula citoplasmática

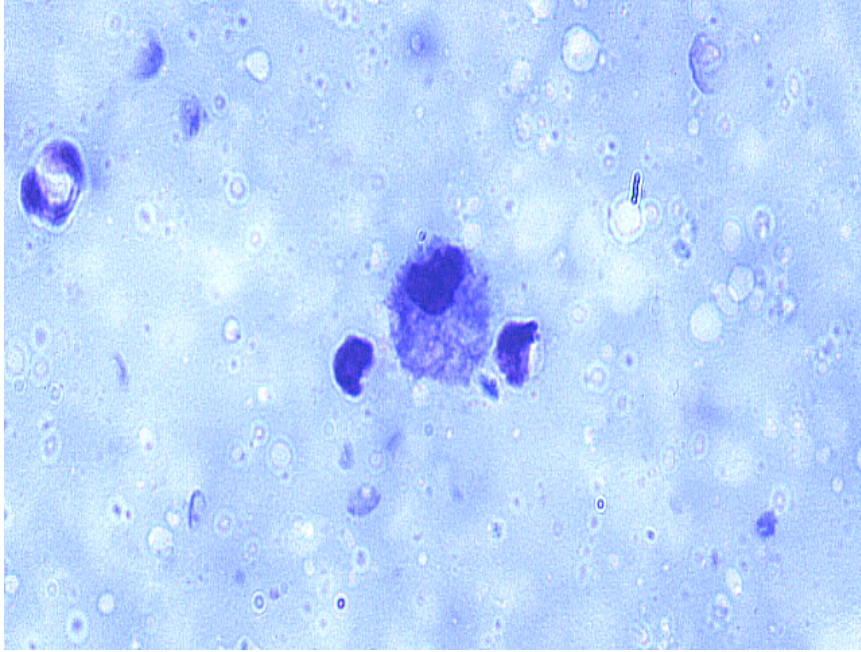


Figura III.3. Tinción May-Grünwald-Giemsa: células somáticas

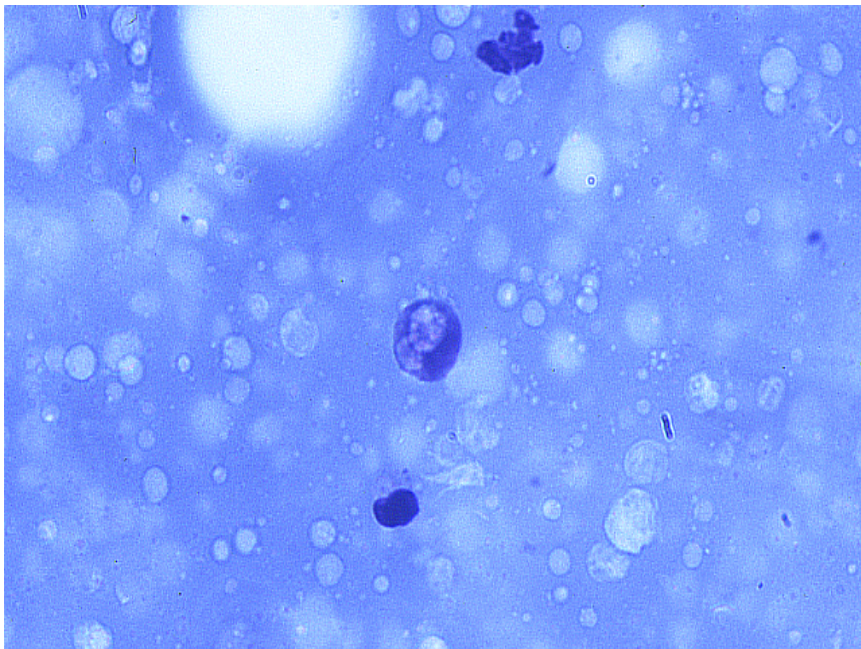


Figura III.4. Tinción May-Grünwald-Giemsa: células somáticas y partícula citoplasmática

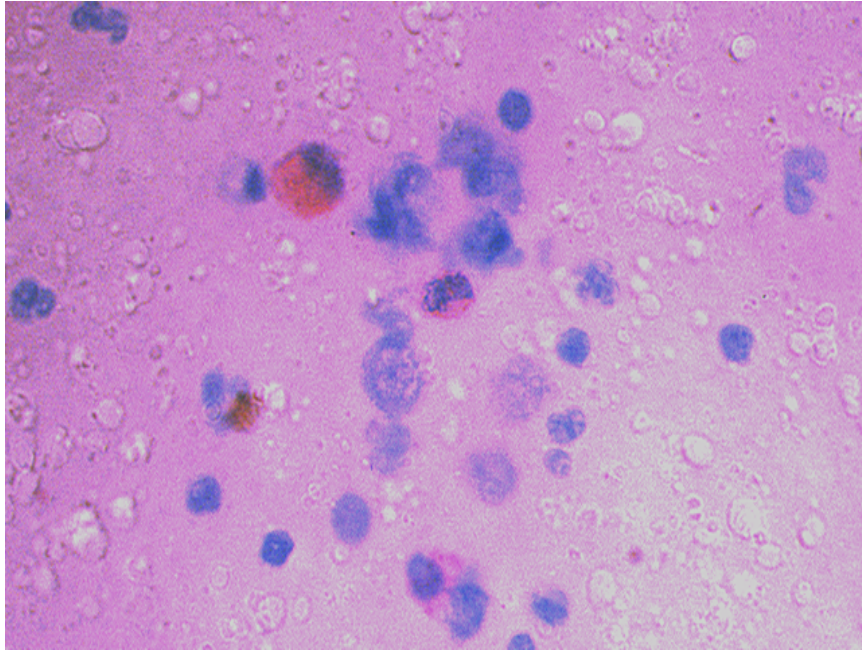


Figura III.5. Tinción pironina Y-verde de metilo: células somáticas

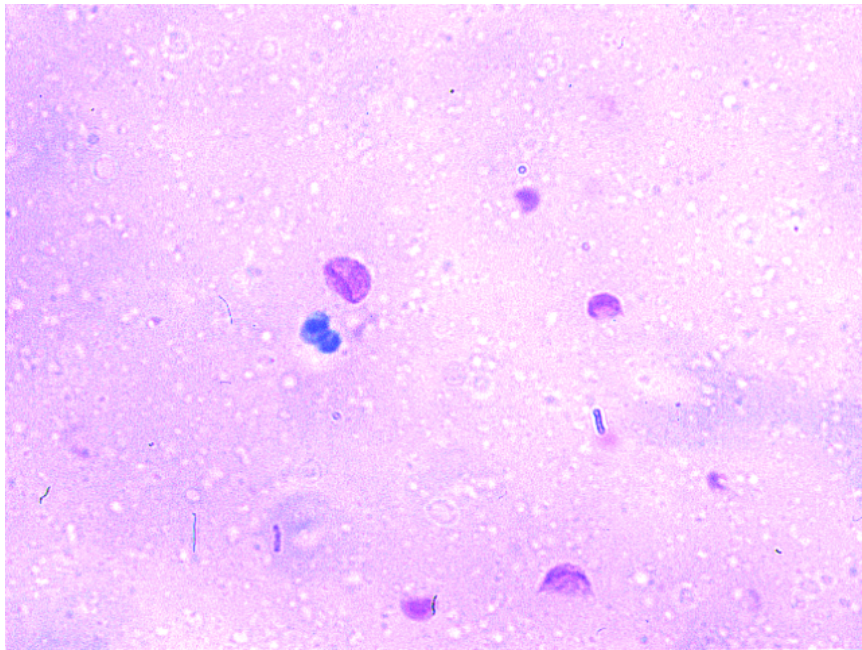


Figura III.6. Tinción pironina Y-verde de metilo: célula somática y partículas citoplasmáticas

El eosinato de azur es un colorante neutro, presente en la tinción Giemsa, que tiñe la cromatina nuclear de un color violeta-rojizo característico (efecto Giemsa). Al unir este último con la tinción May-Grünwald, se logran unos colores más brillantes que los obtenidos con la utilización exclusiva de Giemsa (BURCK, 1969). Así, los núcleos presentaban ese color violeta típico, mientras que el citoplasma, casi exclusivamente apreciable en los macrófagos, y las PC adquirieron una tonalidad menos marcada (Figuras III.3 y III.4). Al igual que en el caso anterior, se contaron como PC las estructuras anucleadas de color semejante al de los citoplasmas y con forma de capuchón.

#### **Pironina Y-verde de metilo**

Fue descrita por PAAPE *et al.* (1963) para leche de vaca, pero nosotros hemos modificado su protocolo:

- Fijación de las películas de leche en la solución Carnoy's durante 10 minutos. Dicha solución presentaba la siguiente composición: 60% de alcohol etílico absoluto, 30% de cloroformo (Merck®) y 10% de ácido acético.
- Eliminación y secado al aire.
- Hidratación sucesiva con alcohol etílico al 50% (2 minutos), con alcohol etílico al 30% (2 minutos) y con agua desionizada (2 minutos).
- Secado al aire.
- Tinción con el colorante PVM (Sigma Diagnostics®) durante 20 minutos y lavado ligero, a continuación, con agua desionizada.
- Secado al aire por última vez.
- Montaje de la preparación con Entellan® y recuento con el objetivo de inmersión.

Al contrario que las anteriores, esta tinción permitió diferenciar perfectamente los núcleos (de color azul claro) de los citoplasmas y PC (de color rosado), debido a su diferente afinidad: el verde de metilo es un colorante básico que se combina con los grupos fosfóricos del ADN nuclear, mientras que la pironina Y lo hace con el ARN citoplasmático (STEVENS y BANCROFT, 1990). De este modo, las PC pudieron distinguirse perfectamente no sólo desde un punto de vista morfológico, sino también desde un punto de vista tintorial (Figuras III.5 y III.6).



### III.1.2.2. RECUENTO DE CÉLULAS SOMÁTICAS MEDIANTE EL MÉTODO FLUORO-OPTO-ELECTRÓNICO

Éste se ajustó estrictamente a la metodología recomendada por la Norma Internacional 148A (FIL-IDF, 1995) y fue realizado en un analizador Fossomatic 90<sup>®</sup> (A/S N. Foss Electric, Hillerød, Dinamarca) (Figura III.7).

Según esta metodología, las células somáticas son aquéllas que presentan una intensidad mínima de fluorescencia debida a la tinción de su núcleo celular. El principio básico del funcionamiento consiste en la mezcla de la leche con una solución colorante nuclear (bromuro de etidio).



Figura III.7. Analizador Fossomatic 90<sup>®</sup>

La dosificación de la leche se hace manualmente, añadiendo con una pipeta 0,5 ml de leche en la cámara de recepción, donde, de manera automática, se mezcla con 9,5 ml de solución colorante. Después de un tiempo de reacción de 10 segundos, la suspensión de células teñidas pasa a una microjeringa, la cual dosifica gradualmente 40  $\mu$ l de suspensión en forma de película fina sobre un disco rotatorio, que hace de plano al microscopio, y sobre el cual incide una luz azul. Seguidamente, tiene lugar la amplificación y registro del impulso eléctrico producido por cada célula

teñida. La lectura directa del número de células somáticas, expresada en miles de células por mililitro, es directamente expresada en el visor digital del aparato.

### Preparación de los reactivos

Se utilizaron los reactivos comercializados por la firma que detenta la patente del método de RCS, y que resultan indicados para el Fossomatic 90<sup>®</sup>.

#### **DISOLUCIONES BASE**

- **Disolución colorante base.** Se disolvieron 4 tabletas (1 gramo) de bromuro de etidio en 1 litro de agua desionizada, acelerando el proceso mediante calentamiento a 40-60° C. Se guardó en una botella cerrada y protegida de la luz a temperatura de refrigeración durante un período de tiempo que no superó los dos meses.
- **Triton X-100<sup>®</sup> al 1%.** Se disolvieron 10 ml de Triton X-100<sup>®</sup> (polietilenglicol mono [p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenil]-éter) en 1 litro de agua desionizada calentada en baño María a 60° C. Se guardó a temperatura ambiente en un recipiente cerrado durante un tiempo máximo de un mes.
- **Disolución tampón base.** Se disolvió el tampón, constituido por 51 g de hidrogenoftalato de potasio y 13,75 g de hidróxido potásico, en 10 litros de agua desionizada, acelerando el proceso mediante calentamiento a 40-60° C. Se guardó en un recipiente cerrado a temperatura ambiente durante un período máximo de dos meses.

#### **DISOLUCIONES DE TRABAJO**

- **Disolución colorante.** Se diluyeron 250 ml del tampón base en 2,2 litros de agua desionizada. A continuación, se añadieron 26 ml de la disolución colorante base de bromuro de etidio y 40 ml de Triton X-100<sup>®</sup> al 1%. No se almacenó durante más de 7 días. Su misión es facilitar la formación del complejo fluorescente ADN-bromuro de etidio.
- **Líquido de limpieza.** Se añadieron 10 ml de Triton X-100<sup>®</sup> y 25 ml de amoníaco al 25% (Panreac<sup>®</sup>) a 10 litros de agua desionizada. No se utilizó pasados 7 días. La finalidad de esta disolución es limpiar todo el circuito del

anализador y la pista del disco rotatorio de los restos de leche que hayan quedado de la muestra anterior.

Tanto las disoluciones de conservante, como las utilizadas para la elaboración de líquidos de trabajo necesarios para el RCS por el método FOE, en ambas experiencias, fueron preparadas con agua desionizada de calidad Milli Q® (Millipore®).

### III.1.3. METODOLOGÍA ESTADÍSTICA

#### III.1.3.1. COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS MICROSCÓPICO Y FLUORO-OPTO-ELECTRÓNICO DE RECUENTO DE CÉLULAS SOMÁTICAS EN LA LECHE DE OVEJA

La comparación entre ambos métodos se realizó utilizando los datos procedentes de las 16 condiciones analíticas diferentes de las muestras de 24 horas de edad, analizadas por el método FOE, y las 3 tinciones del método MD. Dicha comparación se realizó sobre la base de los estudios siguientes:

- Comparación entre las medias aritméticas, logarítmicas y geométricas obtenidas con el método FOE y con el método MD.
- Regresión lineal entre ambos métodos en sus diferentes condiciones analíticas.
- Estudio de los componentes de varianza y de las repetibilidades para cada supuesto analítico.

Para el análisis de los componentes de varianza y de las repetibilidades para cada una de las diferentes condiciones de conservación, almacenamiento y temperatura de análisis de los métodos de recuento ensayados, se utilizó el siguiente modelo:

$$Y_i = \mu + O_i + e_i$$

donde:

$Y_i$  = Variable dependiente log RCS

$\mu$  = Media

$O_i$  = Efecto aleatorio oveja (80 niveles, con 2 réplicas por oveja)

$e_i$  = Residuo.

La repetibilidad de las réplicas, para cada una de las diferentes condiciones analíticas de los métodos MD y FOE de recuento celular, se calculó dividiendo la varianza del factor oveja entre la suma de la varianza residual y la varianza de la oveja:

$$r = \frac{\sigma_o^2}{\sigma_o^2 + \sigma_e^2}$$

#### III.1.3.2. FACTORES EXTRÍNSECOS DE VARIACIÓN ANALÍTICA DEL MÉTODO FLUORO-OPTO-ELECTRÓNICO EN LA LECHE DE OVEJA: INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE CONSERVACIÓN, TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO, EDAD DE LA MUESTRA Y TEMPERATURA DE ANÁLISIS

Fue realizado mediante técnicas de mínimos cuadrados, según el procedimiento GLM del SAS (SAS, 1992). El modelo utilizado para este estudio fue un modelo mixto, con el efecto *oveja* como aleatorio y el resto de los efectos fijos:

$$Y_{ijklm} = \mu + O_i + E_j + A_k + C_l + T_m + EA_{jk} + EC_{jl} + ET_{jm} + AC_{kl} + AT_{km} + CT_{lm} + EAC_{jkl} + EAT_{jkm} + ECT_{jlm} + ACT_{klm} + e_{ijklm}$$

donde:

$Y_{ijklm}$  = Variable dependiente log RCS

$\mu$  = Media

$O_i$  = Efecto aleatorio oveja (80 niveles)

$E_j$  = Efecto fijo edad de la leche (10 niveles correspondientes a las edades: 3 horas, 6 horas, 12 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 7 días y 9 días postordeño)

- $A_k$  = Efecto fijo temperatura de almacenamiento (2 niveles: temperatura ambiente y refrigeración a 4° C)
- $C_l$  = Efecto fijo conservación (4 niveles: sin conservante, dicromato potásico, azidiol y bronopol)
- $T_m$  = Efecto fijo temperatura de análisis (2 niveles: 40° C y 60° C)
- $EA_{jk}$  = Efecto fijo de la interacción edad x almacenamiento
- $EC_{jl}$  = Efecto fijo de la interacción edad x conservación
- $ET_{jm}$  = Efecto fijo de la interacción edad x temperatura de análisis
- $AC_{kl}$  = Efecto fijo de la interacción almacenamiento x conservación
- $AT_{km}$  = Efecto fijo de la interacción almacenamiento x temperatura de análisis
- $CT_{lm}$  = Efecto fijo de la interacción conservación x temperatura de análisis
- $EAC_{jkl}$  = Efecto fijo de la interacción edad x almacenamiento x conservación
- $EAT_{jkm}$  = Efecto fijo de la interacción edad x almacenamiento x temperatura de análisis
- $ECT_{jlm}$  = Efecto fijo de la interacción edad x conservación x temperatura de análisis
- $ACT_{klm}$  = Efecto fijo de la interacción almacenamiento x conservación x temperatura de análisis
- $e_{ijklm}$  = Residuo.

## III.2. EXPERIENCIA II:

Estudio del efecto de la congelación sobre el recuento de células somáticas estimado por el método fluoro-opto-electrónico y de la influencia de la conservación, edad de la muestra, tipo de descongelación y temperatura de análisis sobre el recuento celular de la leche de oveja almacenada a temperatura de congelación (-20° C)

---

### III.2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Un total de 70 muestras individuales de 250 ml de leche de oveja, con un rango de RCS desde  $15 \times 10^3$  hasta  $6,5 \times 10^6$  cél./ml, fueron recogidas de ovejas procedentes de las mismas explotaciones que las de la Experiencia I. De igual modo, se transportaron de forma inmediata al laboratorio de control lechero del Departamento de Producción Animal I de la Universidad de León.

Cada una de las 70 muestras se repartió en 68 alícuotas de 3 ml cada una, tal y como se indica en el esquema de la Tabla III.2. Las 68 alícuotas fueron divididas en 4 bloques de 17 alícuotas cada uno, correspondientes a los 4 tipos de conservación de la experiencia anterior, es decir, sin conservante, con dicromato potásico (0,1 g/100 ml de leche), con azidiol (hasta obtener una concentración final de azida sódica en leche de 0,024 g/100 ml) y con bronopol (0,05 g/100 ml de leche).

De cada grupo de 17 alícuotas, una se conservó a temperatura de refrigeración (4° C) y las 16 restantes se congelaron a -20° C. Las alícuotas refrigeradas fueron analizadas, por duplicado, a las 24 horas de su recogida, tanto a 40° C como a 60° C. Las 16 alícuotas congeladas se dividieron, a su vez, en 4 lotes, correspondientes a las siguientes edades de análisis: 1, 15, 30 y 60 días posrecogida. Para cada edad, se procedió a realizar dos tipos de descongelación: lenta y rápida. La descongelación

lenta consistió en mantener 2 alícuotas a temperatura ambiente (18° C) durante 45 minutos, al cabo de los cuales una de ellas fue calentada, en baño María, durante 15-20 minutos a 40° C y la otra a 60° C, procediéndose a su determinación analítica por duplicado.

La descongelación rápida se realizó en las dos alícuotas restantes, una de las cuales se introdujo directamente en el baño a 40° C, analizándose por duplicado después de 15-20 minutos, procediéndose de igual modo con la otra alícuota, salvo que ésta se calentó a 60° C.

### III.2.2. METODOLOGÍA ANALÍTICA

Se siguió en todo momento el mismo método que en la Experiencia I (III.1.2.2.), utilizando, por lo tanto, un analizador Fossomatic 90<sup>®</sup> (A/S N. Foss Electric, Hillerød, Dinamarca) y ajustándose, asimismo, a la Norma Internacional 148A (FIL-IDF, 1995).

### III.2.3. METODOLOGÍA ESTADÍSTICA

Los datos obtenidos en esta experiencia fueron sometidos a tres tipos de análisis estadísticos: el primero, en el que se compararon los efectos que la refrigeración y la congelación producen sobre el RCS de la leche bajo diferentes condiciones de conservación y de temperatura de análisis; el segundo, restringido exclusivamente a las muestras de leche congelada, donde se analizaron los efectos del tipo de conservación, edad, tipo de descongelación y temperatura de análisis sobre el RCS; y el tercero, donde se compararon la precisión, la correlación, los componentes de varianza y las repetibilidades de los RCS obtenidos en las condiciones óptimas de análisis de la leche descongelada.

#### III.2.3.1. COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA REFRIGERACIÓN Y LA CONGELACIÓN EN FUNCIÓN DEL TIPO DE CONSERVACIÓN UTILIZADA Y DE LA TEMPERATURA DE ANÁLISIS EN LA LECHE DE OVEJA

El análisis estadístico se realizó mediante técnicas de mínimos cuadrados, según el procedimiento GLM del SAS (SAS, 1992). Para ello, se utilizó el siguiente modelo mixto, con el efecto *oveja* como aleatorio y el resto de los efectos fijos.

**Tabla III.2. Diseño experimental.**

**70 ovejas muestreadas (250 ml)**

**68 alícuotas/muestra (3 ml)**

<b>Conservación</b>	<b>Almacenamiento</b>	<b>Edad</b>	<b>T<sup>a</sup> análisis y tipo de descongelación</b>
1 sin conservante	T <sup>a</sup> refrigeración (4° C)	24 h	40 y 60° C
1 con dicromato potásico	T <sup>a</sup> refrigeración (4° C)	24 h	40 y 60° C
1 con azidiol	T <sup>a</sup> refrigeración (4° C)	24 h	40 y 60° C
1 con bronopol	T <sup>a</sup> refrigeración (4° C)	24 h	40 y 60° C
16 sin conservante	T <sup>a</sup> congelación (-20° C)	24 h, 15 d, 30 d y 60 d	40° C-lenta, 40° C-rápida, 60° C-lenta y 60° C-rápida
16 con dicromato potásico	T <sup>a</sup> congelación (-20° C)	24 h, 15 d, 30 d y 60 d	40° C-lenta, 40° C-rápida, 60° C-lenta y 60° C-rápida
16 con azidiol	T <sup>a</sup> congelación (-20° C)	24 h, 15 d, 30 d y 60 d	40° C-lenta, 40° C-rápida, 60° C-lenta y 60° C-rápida
16 con bronopol	T <sup>a</sup> congelación (-20° C)	24 h, 15 d, 30 d y 60 d	40° C-lenta, 40° C-rápida, 60° C-lenta y 60° C-rápida

**(70 ovejas x 64 alícuotas descongeladas x 2 réplicas) + (70 ovejas x 4 alícuotas refrigeradas x 2 temperaturas de análisis x 2 réplicas) = 10.080 observaciones. d: días; h: horas; T<sup>a</sup>: temperatura.**



$$Y_{ijkl} = \mu + O_i + A_j + C_k + T_l + AC_{jk} + AT_{jl} + CT_{kl} + ACT_{jkl} + e_{ijkl}$$

donde:

$Y_{ijkl}$  = Variable dependiente log RCS

$\mu$  = Media

$O_i$  = Efecto aleatorio oveja (70 niveles)

$A_j$  = Efecto fijo almacenamiento (2 niveles: refrigeración y congelación)

$C_k$  = Efecto fijo conservación (4 niveles: sin conservante, dicromato potásico, azidiol y bronopol)

$T_l$  = Efecto fijo temperatura de análisis (2 niveles: 40° C y 60° C)

$AC_{jk}$  = Efecto fijo de la interacción almacenamiento x conservación

$AT_{jl}$  = Efecto fijo de la interacción almacenamiento x temperatura de análisis

$CT_{kl}$  = Efecto fijo de la interacción conservación x temperatura de análisis

$ACT_{jkl}$  = Efecto fijo de la interacción almacenamiento x conservación x temperatura de análisis

$e_{ijkl}$  = Residuo

Fueron incluidos los RCS de todas las edades de congelación y de los dos tipos de descongelación.

### III.2.3.2. ESTUDIO DE LA CONSERVACIÓN, EDAD DE LA LECHE, TIPO DE DESCONGELACIÓN Y TEMPERATURA DE ANÁLISIS SOBRE EL RECUENTO CELULAR DE MUESTRAS DE LECHE INDIVIDUAL DE OVEJA MANTENIDAS A TEMPERATURA DE CONGELACIÓN

Al igual que en el caso anterior, también se utilizó un modelo mixto, con el efecto *oveja* como aleatorio y el resto de los efectos fijos. Dicho modelo fue el siguiente:

$$Y_{ijklm} = \mu + O_i + C_j + E_k + D_l + T_m + CE_{jk} + CD_{jl} + CT_{jm} + ED_{kl} + ET_{km} + DT_{lm} + CED_{jkl} + CET_{jkm} + CDT_{jlm} + EDT_{klm} + e_{ijklm}$$

donde:

$Y_{ijklm}$  = Variable dependiente log RCS

$\mu$  = Media

$O_i$  = Efecto aleatorio oveja (70 niveles)

$C_j$  = Efecto fijo conservación (4 niveles: sin conservante, dicromato potásico, azidiol y bronopol)

$E_k$  = Efecto fijo edad de la leche (4 niveles correspondientes a las edades: 1, 15, 30 y 60 días posrecogida)

$D_l$  = Efecto fijo tipo de descongelación (2 niveles: lenta y rápida)

$T_m$  = Efecto fijo temperatura de análisis (2 niveles: 40° C y 60° C)

$CE_{jk}$  = Efecto fijo de la interacción conservación x edad de la leche

$CD_{jl}$  = Efecto fijo de la interacción conservación x tipo de descongelación

$CT_{jm}$  = Efecto fijo de la interacción conservación x temperatura de análisis

$ED_{kl}$  = Efecto fijo de la interacción edad de la leche x tipo de descongelación

$ET_{km}$  = Efecto fijo de la interacción edad de la leche x temperatura de análisis

$DT_{lm}$  = Efecto fijo de la interacción tipo de descongelación x temperatura de análisis

$CED_{jkl}$  = Efecto fijo de la interacción conservación x edad de la leche x tipo de descongelación

$CET_{jkm}$  = Efecto fijo de la interacción conservación x edad de la leche x temperatura de análisis

$CDT_{jlm}$  = Efecto fijo de la interacción conservación x tipo de descongelación x temperatura de análisis

$EDT_{klm}$  = Efecto fijo de la interacción edad de la leche x tipo de descongelación x temperatura de análisis

$e_{ijklm}$  = Residuo

### III.2.3.3. PRECISIÓN, CORRELACIÓN, COMPONENTES DE VARIANZA Y REPETIBILIDADES ENTRE LOS RECUEENTOS CELULARES OBTENIDOS EN LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE ANÁLISIS

En estos estudios se efectuó la comparación entre los RCS hallados en la condición más adecuada para el análisis de la leche refrigerada (conservada con bronopol y analizada a las 24 horas posrecogida a 40° C) y los encontrados en las

condiciones que, a la vista de los resultados previos, pudieron considerarse mejores para el análisis en leche descongelada (descongelación rápida a los 30 días posrecogida y analizada a 40° C), evaluando los cuatro tipos de conservación empleados.

Concretamente, se efectuaron 3 tipos de estudios, que fueron básicamente los siguientes:

- Comparación entre las medias aritméticas, logarítmicas y geométricas obtenidas a partir de la leche refrigerada y de la congelada.
- Regresión lineal entre ambos tipos de almacenamiento.
- Evaluación de los componentes de varianza y de las repetibilidades.

Los componentes de varianza y las repetibilidades fueron estimados de forma similar a como se indicó en la Experiencia I para la comparación de métodos.



## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



## IV.1. EXPERIENCIA I:

Comparación de los métodos microscópico y fluoro-opto-electrónico de recuento de células somáticas y estudio de la influencia de las condiciones de conservación, temperatura de almacenamiento, edad de la muestra y temperatura de análisis sobre el método fluoro-opto-electrónico en la leche de oveja

---

### IV.1.1. EVALUACIÓN DEL MÉTODO MICROSCÓPICO DIRECTO

#### IV.1.1.1. COMPARACIÓN DE MEDIAS

Tal y como puede apreciarse en la Tabla IV.1, las medias aritméticas correspondientes a las tres tinciones del método MD oscilaron entre 1.473 y 1.534 x 10<sup>3</sup> cél./ml, presentando como valor medio 1.500 x 10<sup>3</sup> cél./ml, lo que supuso una variación entre métodos, con relación a dicho valor, inferior al 2,5%. Por lo que se refiere a las medias geométricas, el valor medio global fue de 474 x 10<sup>3</sup> cél./ml, con extremos entre 455 x 10<sup>3</sup> cél./ml, para la tinción PVM, y 500 x 10<sup>3</sup> cél./ml, para la tinción MGG. En este caso, la variación entre métodos fue de menos del 5,5%.

Tabla IV.1. Medias aritméticas y logarítmicas obtenidas por MD (3 tinciones)

	<b>Media aritmética (x10<sup>3</sup>/ml)</b>	<b>Media logarítmica</b>	<b>Media geométrica (x10<sup>3</sup>/ml)</b>
<b>MD-AM</b>	1.493	5,669	467
<b>MD-MGG</b>	1.534	5,699	500
<b>MD-PVM</b>	1.473	5,658	455

## IV.1. Experiencia I

Estas variaciones resultaron inferiores a las encontradas por PAAPE *et al.* (1963) en leche de vaca, en la que se compararon la tinción PVM con la tinción de Wright, e indican que, en leche de oveja, la tinción AM, que podría considerarse como inespecífica, permite una precisión del RCS similar a la de otras más específicas del ADN nuclear, como la MGG o la PVM.

### IV.1.1.2. COEFICIENTES DE CORRELACIÓN

Dentro del método MD (Tabla IV.2), la correlación más alta (0,990) se produjo entre las tinciones que proporcionan mayor resolución (PVM y MGG), aunque fueron muy elevadas en todos los casos (0,981-0,990).

Tabla IV.2. Coeficientes de correlación dentro del método MD a las 24 horas posrecogida

	<b>AM</b>	<b>MGG</b>	<b>PVM</b>
<b>AM</b>	–	0,981	0,982
<b>MGG</b>	–	–	0,990
<b>PVM</b>	–	–	–

### IV.1.1.3. VARIANZA RESIDUAL Y REPETIBILIDADES

La Tabla IV.3 muestra los valores de F, la varianza residual y las repetibilidades entre réplicas de las tres tinciones estudiadas. La tinción AM mostró una mayor variabilidad entre réplicas que las tinciones MGG y PVM, resultado que es fácilmente explicable, dado que estas últimas confieren una mayor resolución al método que la primera. Las investigaciones conducentes a reducir la varianza del error vinculado a los métodos MD ya fueron propuestas por PAAPE *et al.* en 1963, cuando observó importantes variaciones de la varianza entre réplicas, al utilizar



diferentes tinciones en la leche de vaca, si bien, desde esa fecha hasta el momento actual, no existe información disponible sobre tales estudios en la leche de oveja.

Tabla IV.3. Valores F del *factor oveja*, varianzas residuales, repetibilidades y errores estándar del método MD (3 tinciones)

	Valor F	Varianza residual	Repetibilidad	ES
<b>MD-AM</b>	176,175	0,005703	0,989	0,003
<b>MD-MGG</b>	243,141	0,003658	0,992	0,002
<b>MD-PVM</b>	286,701	0,003514	0,993	0,002

ES: error estándar.

#### IV.1.1.4. PARTÍCULAS CITOPLASMÁTICAS

Se ha evidenciado la presencia constante de PC en leche de oveja, aunque en una cuantía bastante escasa (Tabla IV.4), tal y como fuera constatado por MARTÍNEZ *et al.* (1997). En consonancia con estos autores, la baja concentración en la que se encuentran en leche no parece que pueda tener incidencia en la precisión de los métodos de RCS, si bien, en casos puntuales, tales PC pueden alcanzar elevadas concentraciones, hasta  $95 \times 10^3$  cél./ml, en nuestro caso.

En leche de oveja, otros autores también observaron PC con forma de medialuna o de estructura redonda (SCHALM *et al.*, 1971), desechos celulares y restos membranosos (LEE y OUTERIDGE, 1981), y capuchones también en medialuna y de pequeño tamaño (PERIS *et al.*, 1993), si bien tales estructuras nunca fueron cuantificadas mediante tinciones diferenciales.

Las concentraciones de PC encontradas en la leche de oveja son muy inferiores a las reseñadas en la leche de cabra, en la que se han encontrado entre un 3 y un 94% (DULIN *et al.*, 1982b). En esta especie, DULIN *et al.* (1983b) aseguraron que la aparición de PC era independiente del grado de infección intramamario, ya que era consecuencia del proceso secretor normal en dicha especie, hecho que resulta

coincidente con nuestros datos en leche de oveja, según los cuales, la concentración de este tipo de partículas resultó ser siempre independiente del RCS.

Tabla IV.4. Recuento de PC mediante el método MD por tres tinciones

<b>Tinciones</b>	<b>log PC</b>	<b>antilog (x10<sup>3</sup>/ml)</b>
<b>AM</b>	4,138	14
<b>MGG</b>	4,218	17
<b>PVM</b>	4,236	17

La presencia de PC en la leche de oveja es concordante con la presencia de ciertos fragmentos celulares anucleados encontrados por BROOKER (1978) en todos los sedimentos examinados en leche bovina, en los que había una variación considerable en su cantidad de una muestra a otra, aunque aparecían en número más elevado en leche de repaso que en la procedente de los primeros chorros, y en la obtenida durante las 4-6 primeras semanas de lactación que en la de estadios posteriores. Según este último autor, hay evidencias de que los fragmentos celulares provistos de numerosas microvellosidades son componentes permanentes de la leche de vaca y corroboran los datos expuestos por otros autores, como ANDERSON *et al.* (1975), LEE *et al.* (1980) y PAAPE y TUCKER (1966), que han descrito, igualmente, la presencia de pequeños fragmentos citoplasmáticos en leche de vaca.

Con independencia de que la tinción AM muestre una mayor variabilidad entre réplicas que las otras dos más específicas (MGG y PVM), los similares valores de RCS obtenidos en cada una de ellas, sus elevados coeficientes de correlación (0,981-0,990) y su capacidad discriminadora de PC, en el caso de operarios con experiencia, hacen que esta tinción pueda ser aplicada como referencia en la leche de oveja al igual que lo es en la de vaca. La rapidez y facilidad de aplicación de la tinción AM la hacen preferible a tinciones de protocolo más lento, más caras o más tóxicas.

Sin embargo, en la leche de oveja cabría señalar el hecho de que, con relativa frecuencia, se origina la separación de la película de leche del portaobjetos, especialmente durante el proceso de tinción con el AM. Otro inconveniente de esta última es la necesidad de que el RCS sea efectuado por un operario con experiencia, capaz de diferenciar células de PC. En el caso de carecer de experiencia, la utilización de MGG o PVM resulta obligada, al menos en un primer momento. Estos inconvenientes, junto con la restricción prácticamente exclusiva del método MD a la evaluación temporal de los métodos electrónicos, hacen que pueda considerarse como más conveniente la utilización de tinciones más específicas, como MGG o PVM, que evitarían, además, los problemas anteriormente citados, como consecuencia de su mayor especificidad y de su superior adherencia al portaobjetos.

#### IV.1.2. COMPARACIÓN ENTRE LA MICROSCOPIA DIRECTA Y EL MÉTODO FLUORO-OPTO-ELECTRÓNICO

Con el fin de posibilitar la observación de cada uno de los RCS, expresados en términos de logaritmo decimal, obtenidos por MD (3 tinciones) y por el método FOE a las 24 horas posrecogida, se incluye un anexo al final de esta memoria, donde se recogen los datos correspondientes a las 80 muestras por duplicado.

##### IV.1.2.1. COMPARACIÓN DE MEDIAS

Considerando la media geométrica global ( $474 \times 10^3$  cél./ml) como valor microscópico de referencia, el estudio, en esta misma Tabla IV.5, de las 16 condiciones analíticas ensayadas por el método FOE permitió apreciar que las medias geométricas de las alícuotas almacenadas a temperatura de refrigeración fueron más precisas, es decir, más próximas al valor microscópico de referencia (rango: de 405 a  $491 \times 10^3$  cél./ml) que las muestras mantenidas a temperatura ambiente (rango: de 405 a  $1.000 \times 10^3$  cél./ml). Las muestras sin conservante y mantenidas a temperatura ambiente no deberían ser analizadas, pues las medias aritméticas, logarítmicas y geométricas se elevaron fuertemente, tanto a una temperatura de análisis de 40° C ( $1.516 \times 10^3$  cél./ml, 5,787 y  $612 \times 10^3$  cél./ml, respectivamente), como, sobre todo, a 60° C ( $1.958 \times 10^3$  cél./ml, 6,000 y  $1.000 \times 10^3$  cél./ml, respectivamente). La observación microscópica de este tipo de muestras, inmediatamente después del

#### IV.1. Experiencia I

análisis FOE, permitió evidenciar la presencia de auténticos cúmulos de bacterias, capaces de originar impulsos de ganancia similar a la de las células, que fueron probablemente contados por el analizador Fossomatic<sup>®</sup>, incrementando el RCS (Figuras IV.1 y IV.2).

Tabla IV.5. Medias aritméticas, logarítmicas y geométricas obtenidas por MD (3 tinciones) y por el método FOE a las 24 horas posrecogida

	<b>Media aritmética (x10<sup>3</sup>/ml)</b>	<b>Media logarítmica</b>	<b>Media geométrica (x10<sup>3</sup>/ml)</b>
<b>MD-AM</b>	1.493	5,669	467
<b>MD-MGG</b>	1.534	5,699	500
<b>MD-PVM</b>	1.473	5,658	455
<b>FOE-SC-TA-40</b>	1.516	5,787	612
<b>FOE-DP-TA-40</b>	1.396	5,695	495
<b>FOE-AZ-TA-40</b>	1.279	5,607	405
<b>FOE-BR-TA-40</b>	1.516	5,709	512
<b>FOE-SC-TA-60</b>	1.958	6,000	1.000
<b>FOE-DP-TA-60</b>	1.442	5,722	527
<b>FOE-AZ-TA-60</b>	1.500	5,655	452
<b>FOE-BR-TA-60</b>	1.608	5,680	479
<b>FOE-SC-TR-40</b>	1.204	5,619	416
<b>FOE-DP-TR-40</b>	1.302	5,642	439
<b>FOE-AZ-TR-40</b>	1.273	5,607	405
<b>FOE-BR-TR-40</b>	1.435	5,677	475
<b>FOE-SC-TR-60</b>	1.486	5,685	484
<b>FOE-DP-TR-60</b>	1.550	5,682	481
<b>FOE-AZ-TR-60</b>	1.528	5,671	469
<b>FOE-BR-TR-60</b>	1.571	5,691	491

**40:** análisis a 40° C; **60:** análisis a 60° C; **AZ:** azidiol; **BR:** bronopol; **DP:** dicromato potásico; **SC:** sin conservante; **TA:** T<sup>a</sup> ambiente; **TR:** T<sup>a</sup> de refrigeración.

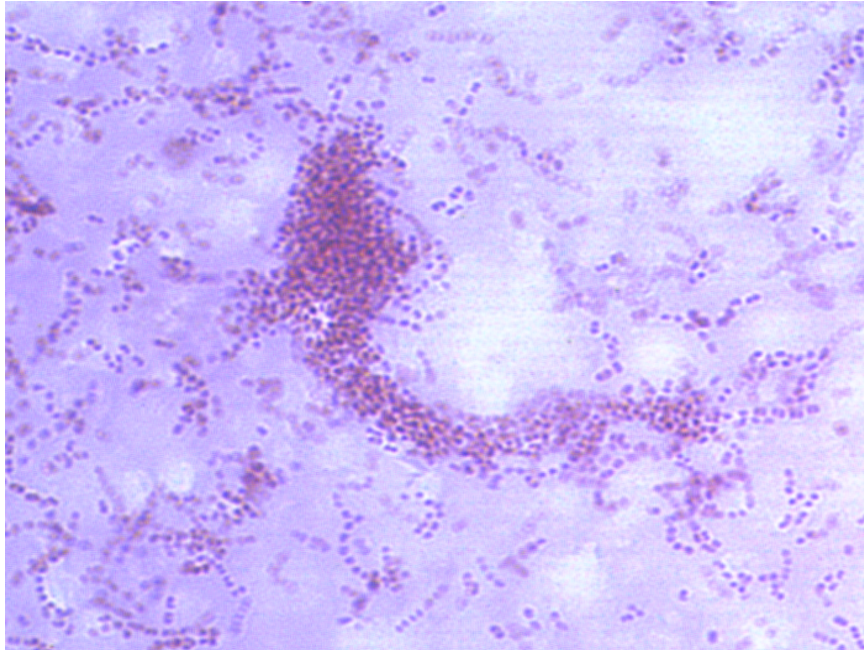


Figura IV.1. Cúmulo bacteriano (tinción pironina Y-verde de metilo)

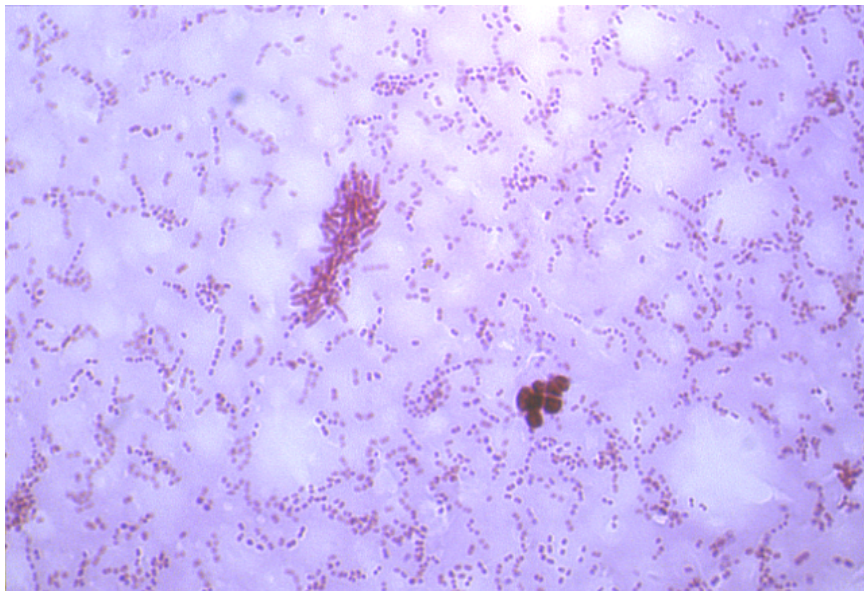


Figura IV.2. Cúmulo bacteriano y célula somática (tinción pironina Y-verde de metilo)

#### IV.1. Experiencia I

---

Dentro del almacenamiento a temperatura de refrigeración, de las cuatro formas de conservación utilizadas, con la que se hallaron valores más altos fue con el bronopol ( $475 \times 10^3$  cél./ml, a  $40^\circ$  C, y  $491 \times 10^3$  cél./ml, a  $60^\circ$  C), seguido del dicromato potásico ( $439 \times 10^3$  cél./ml, a  $40^\circ$  C, y  $481 \times 10^3$  cél./ml, a  $60^\circ$  C), mientras que las muestras con azidiol ( $405 \times 10^3$  cél./ml, a  $40^\circ$  C, y  $469 \times 10^3$  cél./ml, a  $60^\circ$  C) y las que no llevaban conservante y se analizaron a  $40^\circ$  C ( $416 \times 10^3$  cél./ml) dieron lugar a RCS más bajos. Bajo esta modalidad de almacenamiento, y por lo que respecta a la temperatura analítica, las condiciones que originaron RCS más elevados y próximos al valor de referencia fueron aquéllas cuya temperatura de análisis fue de  $60^\circ$  C (rango: de  $469$  a  $491 \times 10^3$  cél./ml) y las de las muestras con bronopol analizadas a  $40^\circ$  C ( $475 \times 10^3$  cél./ml).

#### IV.1.2.2. COEFICIENTES DE CORRELACIÓN

Entre la MD y el método FOE (Tabla IV.6), los menores coeficientes de correlación se establecieron entre las tres variantes microscópicas y las muestras sin conservante, almacenadas a temperatura ambiente y analizadas tanto a  $40^\circ$  C (0,894-0,919) como, sobre todo, a  $60^\circ$  C (0,708-0,776). En todos los demás casos, los coeficientes de correlación entre ambos métodos fueron siempre muy elevados, aunque las correlaciones de las tinciones PVM y, especialmente, MGG fueron ligeramente mayores que las tinciones con AM. En conjunto, tales coeficientes de correlación fueron coincidentes con los encontrados por otros autores en la leche de vaca entre los recuentos MD y FOE ( $r$  entre 0,870 y 0,994), para diferentes factores de trabajo (GRAPPIN Y JEUNET, 1974; HEALD *et al.*, 1977; HEESCHEN, 1975; SCHMIDT-MADSEN, 1975; SCHMIDT-MADSEN, 1979), y con los hallados por GONZALO *et al.* (1993) en leche de oveja (0,986), utilizando la tinción MGG y un factor de trabajo de 1.600.

El valor más elevado se obtuvo entre el método MD con la tinción MGG y el FOE usando bronopol como conservante, almacenando la leche a  $4^\circ$  C y empleando una temperatura analítica de  $60^\circ$  C ( $r = 0,996$ ). Dicha regresión viene representada en la Figura IV.3, en la que se puede observar la práctica superposición de la línea de regresión a la línea a  $45^\circ$ .

Tabla IV.6. Coeficientes de correlación entre el método MD y el FOE

	<b>FOE-SC-TA- 40</b>	<b>FOE-DP-TA- 40</b>	<b>FOE-AZ-TA- 40</b>	<b>FOE-BR-TA- 40</b>
<b>AM</b>	0,895	0,977	0,975	0,981
<b>MGG</b>	0,919	0,992	0,992	0,993
<b>PVM</b>	0,894	0,988	0,984	0,988

	<b>FOE-SC-TA- 60</b>	<b>FOE-DP-TA- 60</b>	<b>FOE-AZ-TA- 60</b>	<b>FOE-BR-TA- 60</b>
<b>AM</b>	<b>0,708</b>	0,961	0,980	0,983
<b>MGG</b>	0,776	0,981	0,994	0,995
<b>PVM</b>	0,732	0,973	0,988	0,992

	<b>FOE-SC-TR- 40</b>	<b>FOE-DP-TR- 40</b>	<b>FOE-AZ-TR- 40</b>	<b>FOE-BR-TR- 40</b>
<b>AM</b>	0,957	0,978	0,972	0,980
<b>MGG</b>	0,978	0,993	0,991	0,993
<b>PVM</b>	0,967	0,988	0,983	0,989

	<b>FOE-SC-TR- 60</b>	<b>FOE-DP-TR- 60</b>	<b>FOE-AZ-TR- 60</b>	<b>FOE-BR-TR- 60</b>
<b>AM</b>	0,978	0,981	0,981	0,982
<b>MGG</b>	0,993	0,995	0,995	<b>0,996</b>
<b>PVM</b>	0,988	0,990	0,990	0,991

**40:** análisis a 40° C; **60:** análisis a 60° C; **AZ:** azidol; **BR:** bronopol; **DP:** dicromato potásico; **SC:** sin conservante; **TA:** T<sup>a</sup> ambiente; **TR:** T<sup>a</sup> de refrigeración.

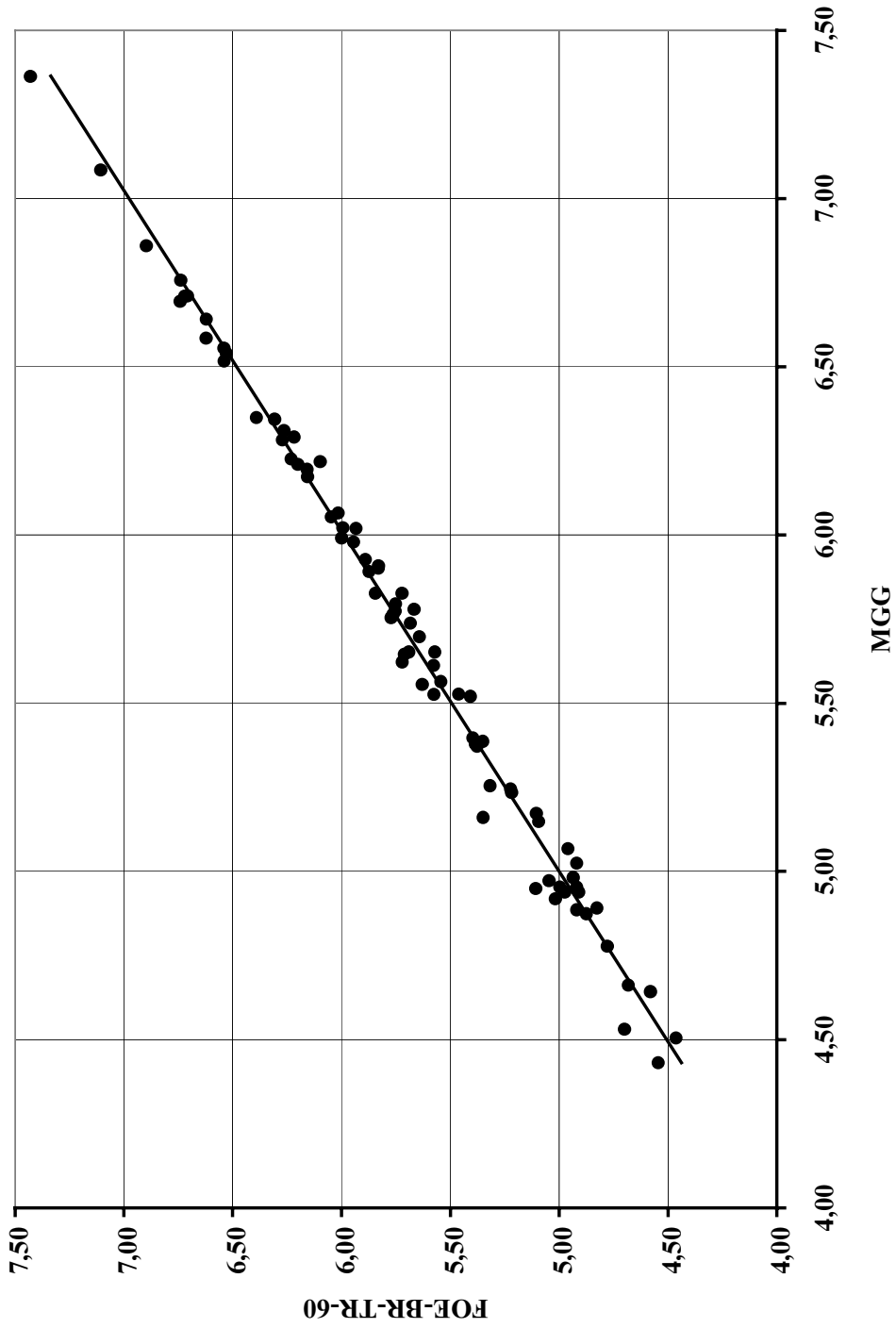


Figura IV.3. Recta de regresión del log RCS de la leche de oveja a las 24 horas posrecogida entre el método FOE (FOE-BR-TR-60) y el MD (tinción MGG)



Por el contrario, el coeficiente de correlación más bajo ( $r = 0,708$ ) correspondió a la regresión establecida entre el método MD con la tinción AM y el FOE sin conservante, almacenando la leche a temperatura ambiente y analizándola a 60° C, representada en la Figura IV.4, en la que se puede apreciar la desviación de la línea de regresión con relación a la teóricamente correcta.

#### IV.1.2.3. VARIANZA RESIDUAL Y REPETIBILIDADES

Como se observa en la Tabla IV.7, la varianza residual fue siempre mayor en los métodos MD que en las diferentes condiciones analíticas del método FOE, como era de esperar, ya que en éste no existe la subjetividad propia del método MD. Estos resultados son igualmente concordantes con la superior repetibilidad de los métodos electrónicos frente al MD en la leche de vaca (SCHMIDT-MADSEN, 1975).

Dentro del método FOE, las muestras de leche almacenadas a temperatura de refrigeración tuvieron varianzas residuales más pequeñas (0,000760-0,001147) que las almacenadas a temperatura ambiente (0,001011-0,002382), lo que conduce, de nuevo, a enfatizar la conveniencia de la refrigeración frente a su ausencia en este método. Si tuviésemos que fijar la condición analítica óptima desde el punto de vista de la repetibilidad del RCS, la leche conservada con bronopol, almacenada en refrigeración y calentada a 40° C en el momento de su análisis fue la que presentó la menor varianza residual, la mayor repetibilidad y el mayor valor de F (Tabla IV.7). Esta condición fue, igualmente, la que presentó la precisión más elevada (Tabla IV.5), según vimos en el epígrafe IV.1.2.1.

A pesar de las diferencias de varianza residual observadas entre ambos métodos y entre las 16 condiciones analíticas del método FOE, el componente de varianza del efecto *oveja* fue muy importante en todos los casos, de manera que las repetibilidades fueron siempre muy elevadas ( $\geq 0,989$ ), pues la variabilidad se debió, fundamentalmente, a la oveja más que a las réplicas.

Sin embargo, una repetibilidad alta no quiere decir que un método sea bueno, ya que dicho método podría sobrestimar siempre el RCS de forma repetible, como ocurre, por ejemplo, en las muestras sin conservante, almacenadas a temperatura ambiente y analizadas a 60° C por el método FOE.

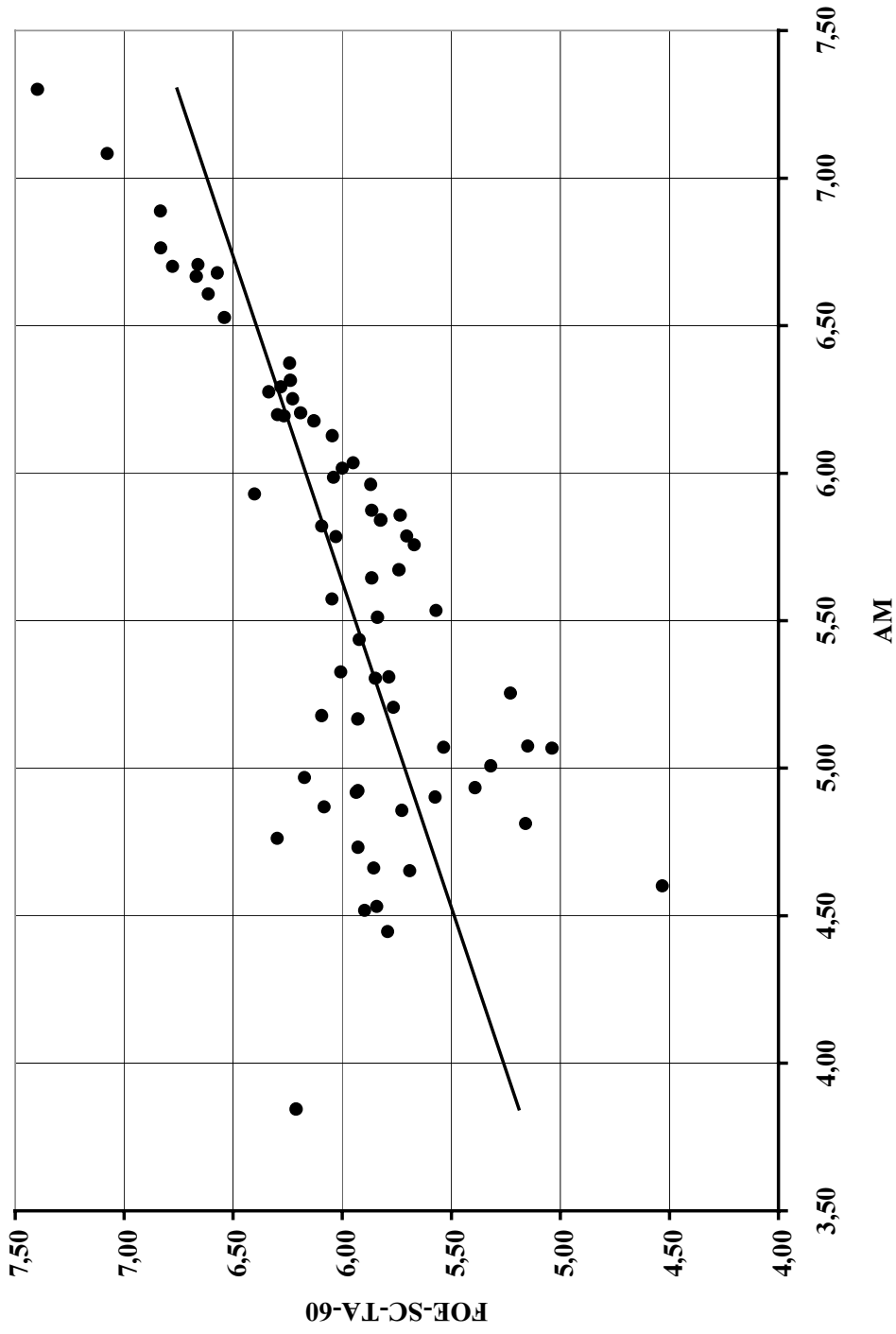


Figura IV.4. Recta de regresión del log RCS de la leche de oveja a las 24 horas posrecogida entre el método FOE (FOE-SC-TA-60) y el MD (tinción AM)

Tabla IV.7. Valores F del *factor oveja*, varianzas residuales, repetibilidades y errores estándar de los distintos métodos de recuento

	<b>Valor F</b>	<b>Varianza residual</b>	<b>Repetibilidad</b>	<b>ES</b>
<b>MD-AM</b>	176,175	0,005703	0,989	0,003
<b>MD-MGG</b>	243,141	0,003658	0,992	0,002
<b>MD-PVM</b>	286,701	0,003514	0,993	0,002
<b>FOE-SC-TA-40</b>	233,868	0,002382	0,991	0,002
<b>FOE-DP-TA-40</b>	409,577	0,001810	0,995	0,001
<b>FOE-AZ-TA-40</b>	579,932	0,001416	0,997	0,001
<b>FOE-BR-TA-40</b>	701,596	0,001110	0,997	0,001
<b>FOE-SC-TA-60</b>	413,159	0,001143	0,995	0,001
<b>FOE-DP-TA-60</b>	660,538	0,001076	0,997	0,001
<b>FOE-AZ-TA-60</b>	880,402	0,001011	0,998	0,001
<b>FOE-BR-TA-60</b>	842,090	0,001094	0,998	0,001
<b>FOE-SC-TR-40</b>	707,918	0,000958	0,997	0,001
<b>FOE-DP-TR-40</b>	677,752	0,001147	0,997	0,001
<b>FOE-AZ-TR-40</b>	694,148	0,001145	0,997	0,001
<b>FOE-BR-TR-40</b>	1.030,743	0,000760	0,998	0,000
<b>FOE-SC-TR-60</b>	818,589	0,001000	0,998	0,001
<b>FOE-DP-TR-60</b>	801,486	0,001077	0,998	0,001
<b>FOE-AZ-TR-60</b>	849,599	0,001025	0,998	0,001
<b>FOE-BR-TR-60</b>	831,671	0,001048	0,998	0,001

**40:** análisis a 40° C; **60:** análisis a 60° C; **AZ:** azidiol; **BR:** bronopol; **DP:** dicromato potásico; **ES:** error estándar; **SC:** sin conservante;; **TA:** T<sup>a</sup> ambiente; **TR:** T<sup>a</sup> de refrigeración.

#### *IV.1. Experiencia I*

---

Por lo que respecta a este último método, estos resultados preliminares permitieron evidenciar que la refrigeración y la conservación de la leche fueron condiciones claramente favorables de la precisión, correlación y repetibilidad de los RCS. Ambas condiciones serían, por tanto, las más favorables para garantizar la integridad celular, una vez que la leche abandona la glándula mamaria.

A las 24 horas posrecogida, las mejores condiciones analíticas de cara al RCS se darían en aquellas muestras conservadas con bronopol, mantenidas en refrigeración y analizadas a 40° C. No obstante, un estudio exhaustivo de los factores de variación del RCS en condiciones de laboratorio resulta recomendable en este método.

#### IV.1.3. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA CONSERVACIÓN, ALMACENAMIENTO, EDAD DE LA LECHE Y TEMPERATURA DE ANÁLISIS SOBRE LOS RECUENTOS CELULARES ESTIMADOS POR EL MÉTODO FLUORO-OPTO-ELECTRÓNICO

La Tabla IV.8 muestra las medias, desviación estándar y coeficiente de variación del RCS para el total de las 23.003 observaciones analíticas del presente estudio. Este valor fue algo inferior a las 25.600 observaciones teóricas del diseño experimental, debido a que algunas muestras se desnaturalizaron antes de su procesamiento analítico, particularmente aquellas que no tuvieron conservante.

Tabla IV.8. Medias, desviaciones estándar y coeficientes de variación del RCS para el total de observaciones (n = 23.003) del presente estudio

	<b>Medias</b>	<b>DE</b>	<b>CV (%)</b>
<b>RCS (x 10<sup>3</sup>/ml)</b>	1.407	459	32,60
<b>log RCS</b>	5,662	0,117	-

CV: coeficiente de variación; DE: desviación estándar.

El análisis de varianza (Tabla IV.9) mostró que la conservación, la temperatura de análisis, la edad de la muestra, el tipo de almacenamiento y la mayoría de sus interacciones dobles y triples incidieron significativamente ( $p < 0,05$ ) sobre el RCS de la leche. La única interacción que no arrojó significación estadística fue la edad x almacenamiento x temperatura de análisis ( $p \geq 0,05$ ).

Tabla IV.9. Análisis de varianza (ANOVA) de los factores de variación del logaritmo del RCS de la leche analizada con el método FOE

Fuentes de variación	gl	F
Oveja	79	8.170,3** *
Conservación	3	254,7***
Temperatura de análisis	1	284,5***
Edad de la muestra	9	40,6***
Almacenamiento	1	69,7***
Edad x Almacenamiento	9	57,7***
Edad x Conservación	27	49,6***
Conservación x Temperatura de análisis	3	113,6***
Almacenamiento x Conservación	3	26,0***
Edad x Temperatura de análisis	9	17,7***
Almacenamiento x Temperatura de análisis	1	4,6*
Almacenamiento x Conservación x Temperatura	3	12,2***
Edad x Almacenamiento x Conservación	27	29,6***
Edad x Conservación x Temperatura de análisis	27	6,5***
Edad x Almacenamiento x Temperatura de análisis	9	1,3 <sup>NS</sup>
Error	22.791	

gl: grados de libertad.

\*\*\* $p < 0,001$ ; \* $p < 0,05$ ; <sup>NS</sup>no significativo ( $p \geq 0,05$ ).

#### IV.1.3.1. CONSERVACIÓN

El efecto de la conservación sobre el RCS ( $p < 0,001$ ) se indica en la Tabla IV.10. Los valores más elevados correspondieron a la leche sin conservante ( $520 \times 10^3$  cél./ml), seguida por la leche con bronopol ( $467 \times 10^3$  cél./ml), dicromato potásico ( $431 \times 10^3$  cél./ml) y, en último lugar, azidiol ( $422 \times 10^3$  cél./ml), con los RCS más bajos. El valor obtenido con el bronopol fue el más próximo al valor microscópico de referencia ( $474 \times 10^3$  cél./ml).

Tabla IV.10. Efecto de la conservación sobre el RCS de la leche de oveja analizada con el método FOE

Conservación	MMC	ES	antilog MMC ( $\times 10^3$ /ml)
Sin conservante	5,716 <sup>a</sup>	0,002	520
Bronopol	5,669 <sup>b</sup>	0,001	467
D. Potásico	5,634 <sup>c</sup>	0,001	431
Azidiol	5,625 <sup>d</sup>	0,001	422

MMC: medias de mínimos cuadrados; ES: error estándar.

<sup>a,b,c,d</sup>Medias con letras distintas en la misma columna, diferencias  $p < 0,001$ .

Estos resultados fueron concordantes con los reseñados anteriormente (Experiencia I: epígrafe IV.1.2.1) e indicaron una sobrestimación ficticia del RCS en la leche sin conservantes debido a la proliferación bacteriana, así como una gradación en la respuesta celular en función del conservante usado, con valores más elevados en el caso del bronopol y más bajos para el azidiol. No obstante, y a pesar de las diferencias, el descenso del RCS entre muestras conservadas con ambos conservantes fue inferior al 10%. La escasa información disponible sobre estos aspectos parece ser concordante, al menos parcialmente, con nuestros resultados, particularmente en la

leche de vaca, donde BERTRAND (1996) encontró RCS superiores en leche conservada con bronopol, aunque tales diferencias no alcanzaron significación estadística.

Desde un punto de vista práctico, y con la excepción de la leche sin conservante, las diferencias expresadas en la Tabla IV.10 podrían no resultar demasiado importantes dentro de la sistemática del Control Lechero Oficial de las ovejas pertenecientes a las asociaciones de productores; sin embargo, tales diferencias son muy importantes en el control de calidad de los aparatos y de los laboratorios, así como en la confección de patrones de RCS conocido que se distribuyen entre los laboratorios participantes en los ensayos intercomparativos.

#### IV.1.3.2. TEMPERATURA DE ANÁLISIS

La Tabla IV.11 indica que, al igual que en la leche de vaca (MILLER *et al.*, 1986), los RCS a 60° C ( $474 \times 10^3$  cél./ml) fueron significativamente más elevados ( $p < 0,001$ ) que a 40° C ( $442 \times 10^3$  cél./ml), probablemente porque una alta temperatura favorece una mayor penetración del bromuro de etidio en la célula, o bien porque dispersa mejor la grasa de la leche de oveja, que, como es conocido (FUERTES *et al.*, 1998), presenta un elevado contenido graso. A esto hay que añadir, como ya ha sido evidenciado en el epígrafe IV.1.2.1, que el RCS llevado a cabo a 60° C está más cercano, en general, al valor microscópico de referencia.

Tabla IV.11. Efecto de la temperatura de análisis sobre el RCS de la leche de oveja analizada por el método FOE

Temperatura	MMC	ES	antilog MMC (x 10 <sup>3</sup> /ml)
40°C	5,645 <sup>b</sup>	0,002	442
60°C	5,676 <sup>a</sup>	0,002	474

ES: error estándar; MMC: media de mínimos cuadrados.

<sup>a,b</sup>Medias con letras distintas en la misma columna, diferencias  $p < 0,001$ .

Estos hechos son de gran interés, puesto que la recomendación del método oficial en leche de vaca (FIL-IDF, 1995) es la de una temperatura de análisis de 40° C. Sin embargo, los resultados encontrados en la leche de oveja sugieren una mayor precisión del RCS a 60° C, lo cual supone una clara diferencia específica, vinculada, probablemente, a la diferente composición de la leche de estas especies.

### IV.1.3.3. EDAD

La Figura IV.5 muestra la evolución del RCS con la edad de la muestra de leche de oveja, permitiendo evidenciar, en un primer momento, un aumento del RCS en las primeras 24 horas postordeño. El valor más elevado correspondió a esta edad, posiblemente porque en ese momento sea máxima la penetración intracelular del colorante. MILLER *et al.* (1986) también encontraron que las muestras analizadas a las 24 horas presentaban un RCS mayor que las procesadas en el mismo día de recogida, aunque esa diferencia era pequeña y no significativa. A continuación, nosotros registramos que el RCS disminuyó muy lenta y progresivamente hasta el día 9 posrecogida. La disminución de la media geométrica, desde las 24 horas hasta el día 9, fue del 20%. A partir del 5° día, la caída del RCS fue mayor del 10%, lo que a efectos prácticos aconseja no rebasar esta edad de la leche. Esta caída del RCS con la edad de la muestra ha sido también demostrada en la leche de oveja por GONZALO *et al.* (1993). Estos últimos autores determinaron un descenso del RCS del 14% desde el primer día al séptimo posrecogida, lo cual es plenamente coherente con nuestros resultados, a la vez que indica un progresivo deterioro celular consecuente al envejecimiento de la leche.

Este efecto es conocido en la leche de vaca desde que KENNEDY *et al.* (1982) determinaron un descenso del 28-36% del RCS de muestras de esta especie conservadas y almacenadas a temperatura ambiente durante 8 días o más.

### IV.1.3.4. ALMACENAMIENTO

El efecto del modo de almacenamiento de la leche sobre el RCS por el método FOE (Tabla IV.12) se tradujo en RCS significativamente ( $p < 0,001$ ) más elevados a temperatura de refrigeración ( $469 \times 10^3$  cél./ml) que a temperatura



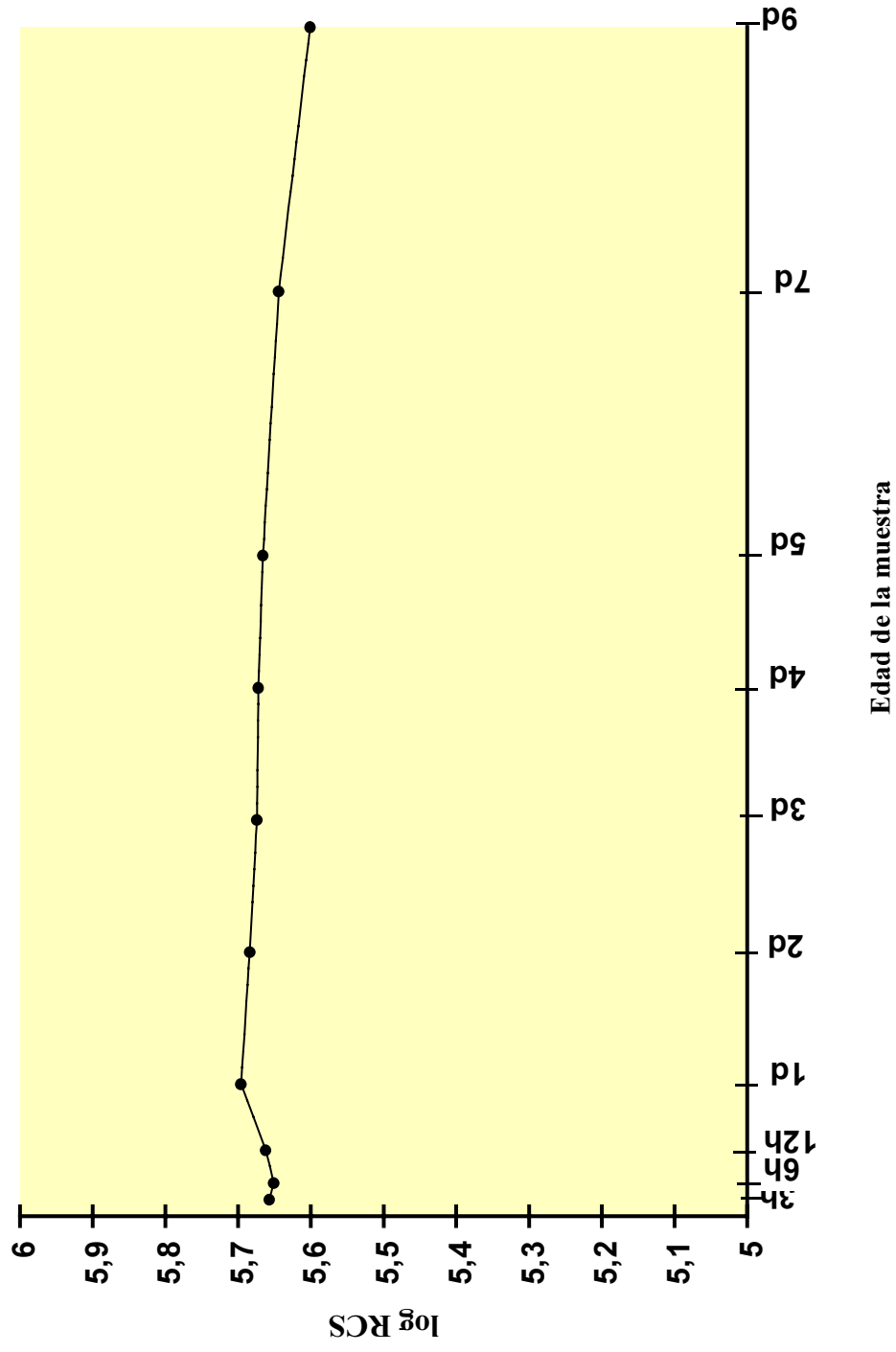


Figura IV.5. Evolución del RCS de la leche de oveja en función de la edad de la muestra analizada por el método FOE

#### *IV.1. Experiencia I*

---

ambiente ( $447 \times 10^3$  cél./ml). Este incremento fue del 5% en términos de media geométrica, indicando una mejor conservación de las células mantenidas en refrigeración. Estos resultados coincidieron con el trabajo de GONZALO *et al.* (1993), los cuales también atribuyeron al almacenamiento de la muestra un efecto altamente significativo ( $p < 0,001$ ) sobre el RCS de la leche de oveja, si bien las insalvables diferencias en el diseño de las experiencias nos impiden una discusión adecuada de los resultados.

Tabla IV.12. Efecto del modo de almacenamiento de la leche (refrigeración o temperatura ambiente) sobre el RCS de la leche de oveja analizada por el método FOE

<b>Almacenamiento</b>	<b>MMC</b>	<b>ES</b>	<b>antilog MMC</b> <b>(x 10<sup>3</sup>/ml)</b>
<b>Refrigeración</b>	5,671 <sup>a</sup>	0,001	469
<b>T<sup>a</sup> ambiente</b>	5,650 <sup>b</sup>	0,002	447

**MMC:** media de mínimos cuadrados; **ES:** error estándar.

<sup>a,b</sup>Medias con letras distintas en la misma columna, diferencias  $p < 0,001$ .

#### IV.1.3.5. INTERACCIONES

La Figura IV.6 muestra la interacción entre la edad y la temperatura de almacenamiento. Tal y como puede verse, las muestras almacenadas a 4° C obtuvieron una evolución prácticamente paralela al eje de abscisas, incluso en las primeras horas posrecogida, alcanzándose el valor máximo el 5° día ( $495 \times 10^3$  cél./ml) y descendiendo tan sólo a  $469 \times 10^3$  cél./ml, en términos de medias geométricas, al cabo de todo el período de envejecimiento. Por lo que respecta a las muestras almacenadas a temperatura ambiente, a las 3 horas se logró la misma media geométrica ( $454 \times 10^3$  cél./ml) que en las muestras refrigeradas, pero el RCS fue aumentando hasta las 24 horas, momento en el que se alcanzó el máximo ( $543 \times 10^3$  cél./ml), a partir del cual comenzó a descender, consiguiéndose ya RCS

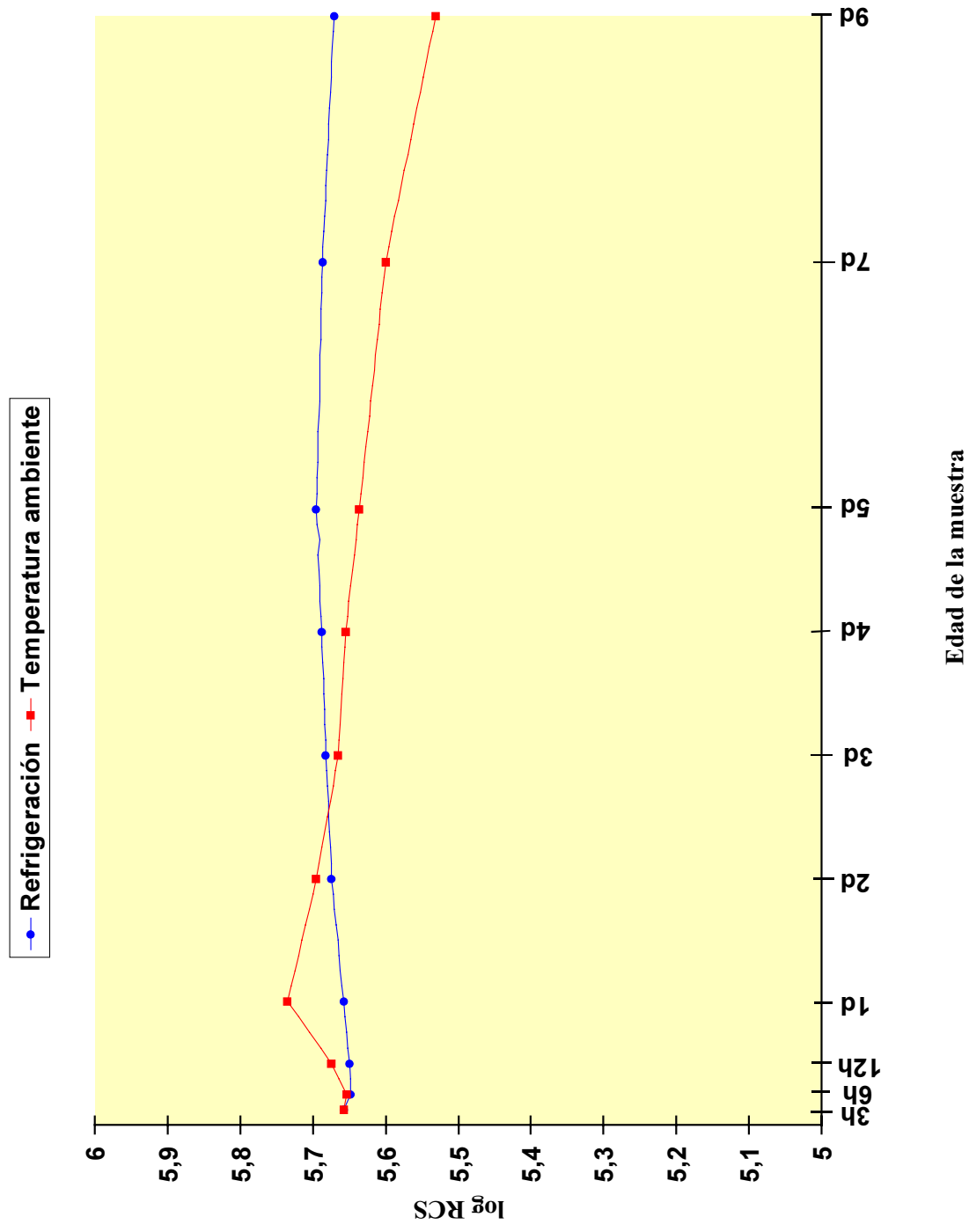
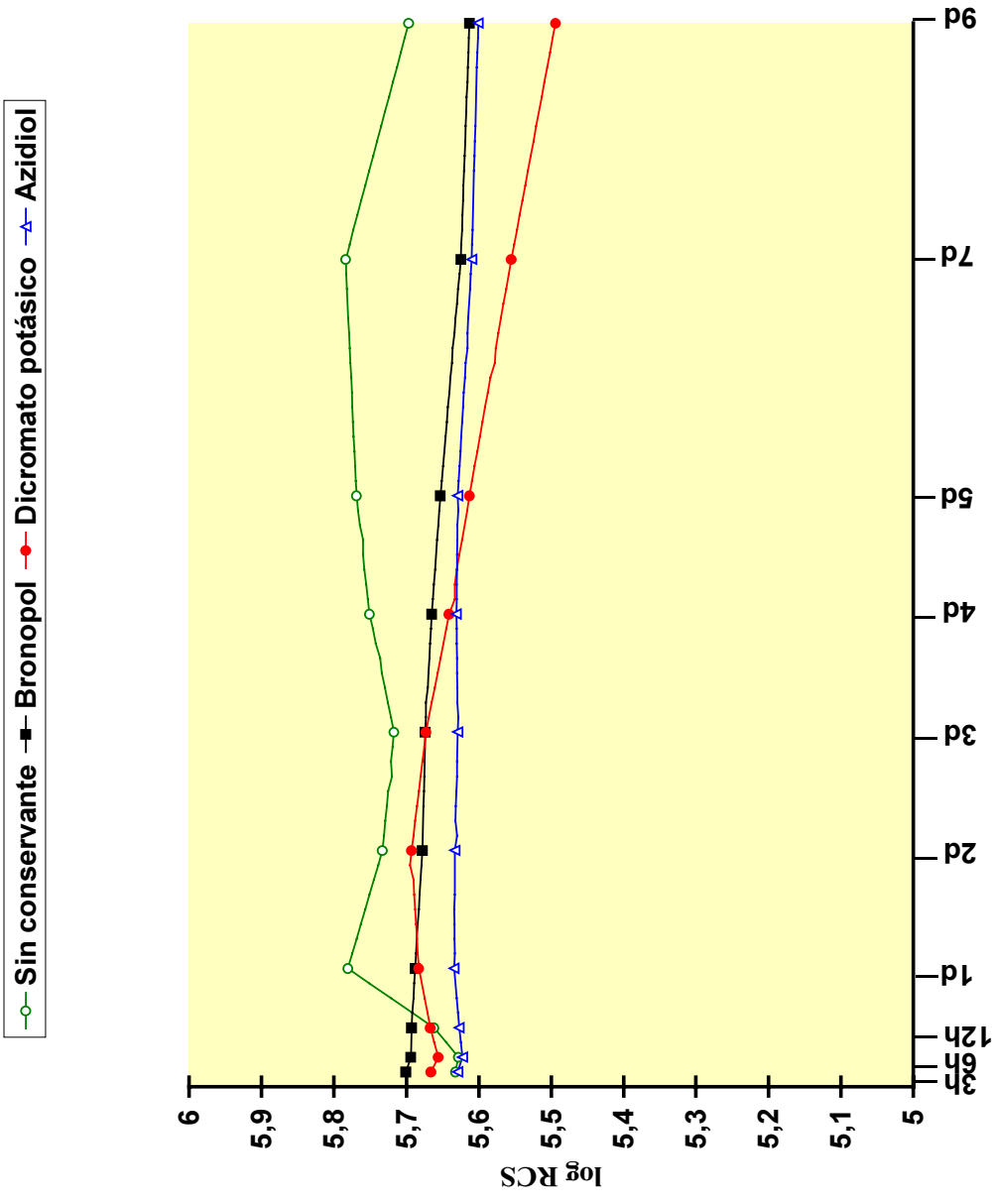


Figura IV.6. Evolución del RCS con la edad de la muestra de leche bajo dos condiciones diferentes de almacenamiento de la leche, según el método FOE

más bajos que en refrigeración a partir del tercer día. Esta disminución fue más pronunciada a partir del 7º día, habiendo descendido el 9º más del 30% respecto al primero. Todo ello indica que las condiciones óptimas de almacenamiento de la leche son las de refrigeración, confirmando igualmente los comentarios derivados de la Tabla IV.12.

Esta interacción es concordante, igualmente, con los resultados de GRAPPIN y JEUNET (1974), quienes, en leches conservadas con dicromato potásico, constataron que no había modificación sensible de los resultados de RCS después de un almacenamiento de las muestras a 4º C durante 2 ó 3 semanas, mientras que, si éstas eran conservadas a 20º C, aparecía un descenso muy importante de los RCS más allá de los 3 días de conservación.

En la Figura IV.7 podemos observar la interacción de la edad x conservación. Según puede apreciarse, existe un comportamiento muy diferente en las muestras sin conservante respecto a las muestras conservadas. En efecto, las no-conservadas siguieron una evolución irregular, los RCS aumentaron rápidamente hasta las 24 horas, descendieron hasta el 3º día, volvieron a aumentar hasta el 7º, para comenzar a descender de nuevo hasta el 9º día, pero manteniéndose siempre por encima de las conservadas a partir de las 12 horas y durante los 9 días que duró el experimento. En cuanto a las muestras con dicromato potásico, lograron un máximo el 2º día, descendiendo de forma acusada (descenso del 37% en términos de media geométrica) hasta el 9º día, momento en el que se alcanzó el mínimo de las 4 formas de conservación. SCHMIDT-MADSEN (1979) evidenció que, si las muestras eran conservadas con dicromato potásico, los RCS tardaban en estabilizarse de 5 a 8 horas; de este modo, las muestras así conservadas podrían ser analizadas por el método FOE pasado ese tiempo. Estas variaciones en las primeras horas posrecogida fueron confirmadas por nuestros resultados, con RCS inferiores el primer día de edad, si bien estas variaciones parecen de escasa entidad. Igualmente, GRAPPIN Y JEUNET (1974) mostraron incrementos del 9 al 19% de RCS en leche conservada con dicromato potásico tras una noche de almacenamiento a 4º C, mientras que tales incrementos fueron muy superiores (24-37%) en las mismas alícuotas sin conservante, en concordancia con la Figura IV.7.



Edad de la muestra

Figura IV.7. Evolución del recuento celular con la edad de la muestra de leche en función de la conservación de la misma, según el método FOE

El RCS de las muestras con azidiol se mantuvo prácticamente constante, pues la variación de las medias geométricas fue inferior al 10% a lo largo de los 9 días, aunque siempre presentó valores más bajos que el resto de conservantes durante los primeros 4 días de edad. A partir de este momento, fueron las muestras con dicromato potásico las que tuvieron los RCS más bajos.

Por último, en las muestras conservadas, el bronopol proporcionó casi siempre los mayores valores y la evolución más coherente, disminuyendo de manera uniforme desde las tres horas posrecogida ( $502 \times 10^3$  cél./ml) hasta el 9º día ( $410 \times 10^3$  cél./ml), lo que supone un porcentaje de disminución del 18%.

En la Tabla IV.13 presentamos la interacción conservación x temperatura de análisis. El RCS más elevado se apreció en la leche sin conservante analizada a 60º C, mientras que el menor se observó en la leche con azidiol y analizada a 40º C. En el caso del bronopol y del dicromato potásico, no hubo diferencias significativas entre las muestras analizadas a 40º C y a 60º C, aunque sí se apreciaron en el caso del azidiol y de las muestras sin conservante, pues a 60º C se hallaron valores significativamente ( $p < 0,001$ ) más altos.

Estos resultados son plenamente concordantes con los obtenidos anteriormente (epígrafes IV.1.3.1 y IV.1.3.2) en el presente estudio e indican la necesidad de calentar las muestras a 60º C en el caso de la utilización de azidiol como conservante.

En la Tabla IV.14, que representa la interacción almacenamiento x conservación, se evidenciaron RCS significativamente más elevados en las muestras conservadas y almacenadas en refrigeración, al contrario de lo que ocurrió en las muestras sin conservante, donde no se apreciaron diferencias de RCS entre ambos tipos de almacenamiento. Entre las muestras conservadas, el conservante que proporcionó mayores RCS fue, de nuevo, el bronopol, aunque siempre fueron inferiores a los obtenidos en muestras sin conservante, que, como ya comentamos, presentan RCS anormalmente elevados en razón de los cúmulos bacterianos, capaces de originar impulsos con ganancia suficiente como para incrementar el RCS.

Tabla IV.13. Efecto de la interacción conservación x temperatura de análisis sobre el RCS de la leche de oveja analizada por el método FOE

Conservación	MMC		antilog MMC (x 10 <sup>3</sup> /ml)	
	40°C	60°C	40°C	60°C
Sin conservante	5,682 <sup>b</sup>	5,749 <sup>a</sup>	481	561
Bronopol	5,668	5,669	466	467
D. Potásico	5,636	5,632	433	429
Azidiol	5,596 <sup>b</sup>	5,653 <sup>a</sup>	394	450

MMC: media de mínimos cuadrados.

<sup>a,b</sup>Medias con letras distintas en la misma fila, diferencias  $p < 0,001$ .

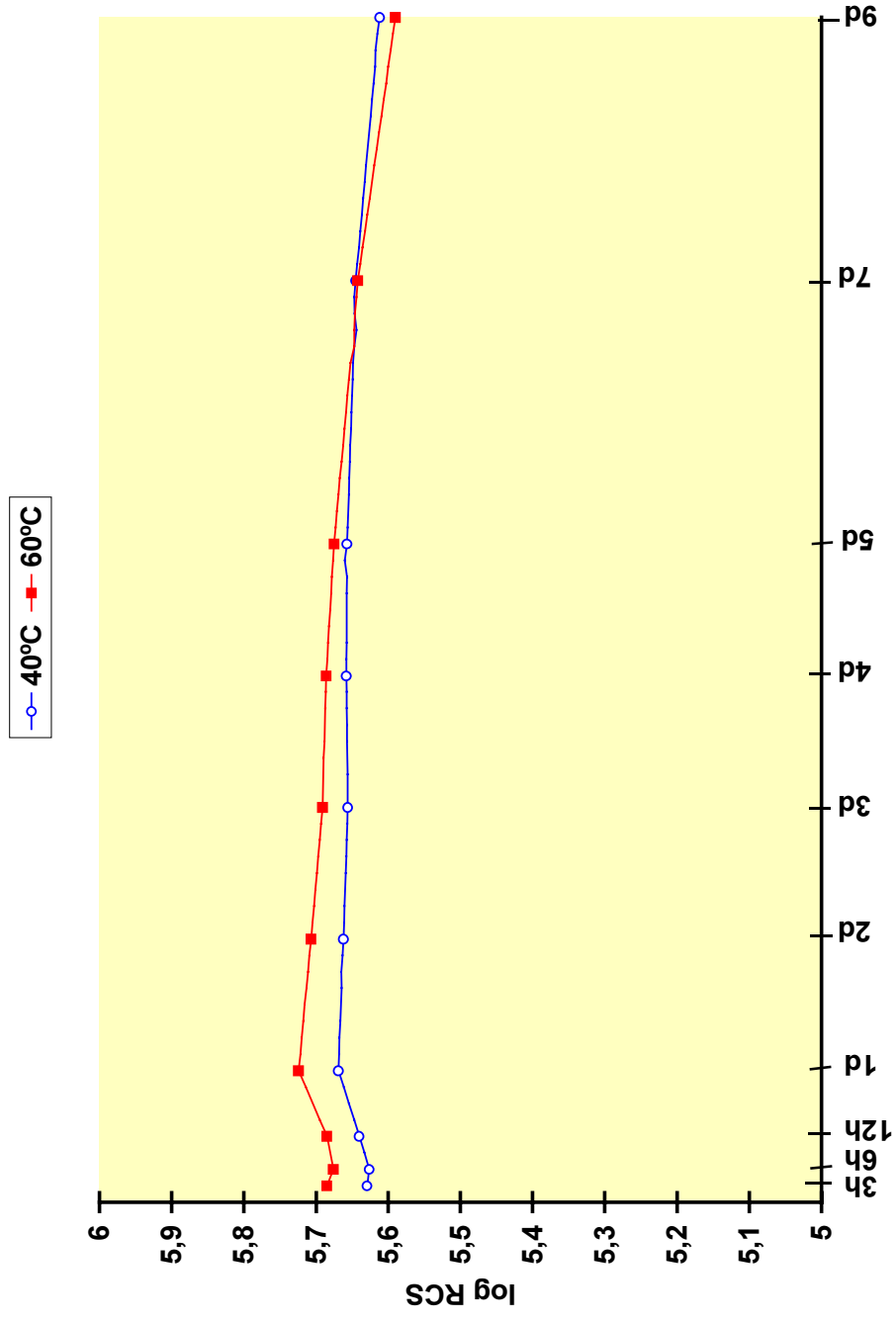
Tabla IV.14. Efecto de la interacción almacenamiento x conservación sobre el RCS de la leche analizada por el método FOE

Conservación	MMC		antilog MMC (x 10 <sup>3</sup> /ml)	
	Refrigeración	T <sup>a</sup> ambiente	Refrigeración	T <sup>a</sup> ambiente
Sin conservante	5,709	5,722	512	527
Bronopol	5,682 <sup>a</sup>	5,655 <sup>b</sup>	481	452
D. potásico	5,659 <sup>a</sup>	5,609 <sup>b</sup>	456	406
Azidiol	5,635 <sup>a</sup>	5,614 <sup>b</sup>	432	411

MMC: medias de mínimos cuadrados.

<sup>a,b</sup>Medias con diferentes letras en la misma fila, diferencias  $p < 0,001$ .

De nuevo, la interacción entre edad x temperatura de análisis (Figura IV.8) nos permitió constatar RCS más elevados para una temperatura de análisis de 60° C durante casi todo el período de envejecimiento de las muestras de leche (hasta el 5° día), siendo sólo un poco inferiores (5% de la media geométrica) a los hallados a



**Edad de la muestra**

Figura IV.8. Efecto de la interacción edad x temperatura de análisis sobre el RCS de la leche de oveja por el método FOE



40°C el día 9. MILLER *et al.* (1986) evidenciaron que el incremento en el RCS que se producía al analizar la leche a 60° C, en vez de a 40° C, era mayor en muestras analizadas el mismo día de recogida que en muestras almacenadas durante 24 horas. Estos resultados parecen confirmarse en la Figura IV.8, en la que se observa una mayor diferencia de RCS entre temperaturas en el primer día de análisis que en los siguientes.

Tabla IV.15. Efecto de la interacción almacenamiento x conservación x temperatura de análisis sobre el RCS analizado por el método FOE

	MMC		antilog MMC (x 10 <sup>3</sup> /ml)	
	40° C	60° C	40° C	60° C
<b>Refrigeración</b>				
Sin conservante	5,687 <sup>b</sup>	5,732 <sup>a</sup>	486	540
Bronopol	5,677 <sup>b</sup>	5,686 <sup>a</sup>	475	485
D. potásico	5,659	5,659	456	456
Azidiol	5,608 <sup>b</sup>	5,661 <sup>a</sup>	406	458
<b>T<sup>a</sup> ambiente</b>				
Sin conservante	5,677 <sup>b</sup>	5,767 <sup>a</sup>	475	585
Bronopol	5,659	5,652	456	449
D. potásico	5,613	5,606	410	404
Azidiol	5,584 <sup>b</sup>	5,644 <sup>a</sup>	384	441

MMC: media de mínimos cuadrados.

<sup>a,b</sup> Medias con diferentes letras en la misma fila difieren p < 0,05.

El efecto de la interacción almacenamiento x conservación x temperatura de análisis se resume en la Tabla IV.15, donde apreciamos que los RCS fueron significativamente más elevados a 60° C, excepto en el caso de muestras conservadas con bronopol y mantenidas a temperatura ambiente, y de muestras con dicromato potásico en cualquier temperatura de almacenamiento, donde no se apreciaron diferencias.

Esta interacción permitió constatar los bajos RCS de la leche conservada con azidiol y analizada a 40° C y la necesidad de aumentar a 60° C la temperatura analítica de estas muestras con el fin de mejorar la exactitud del RCS.

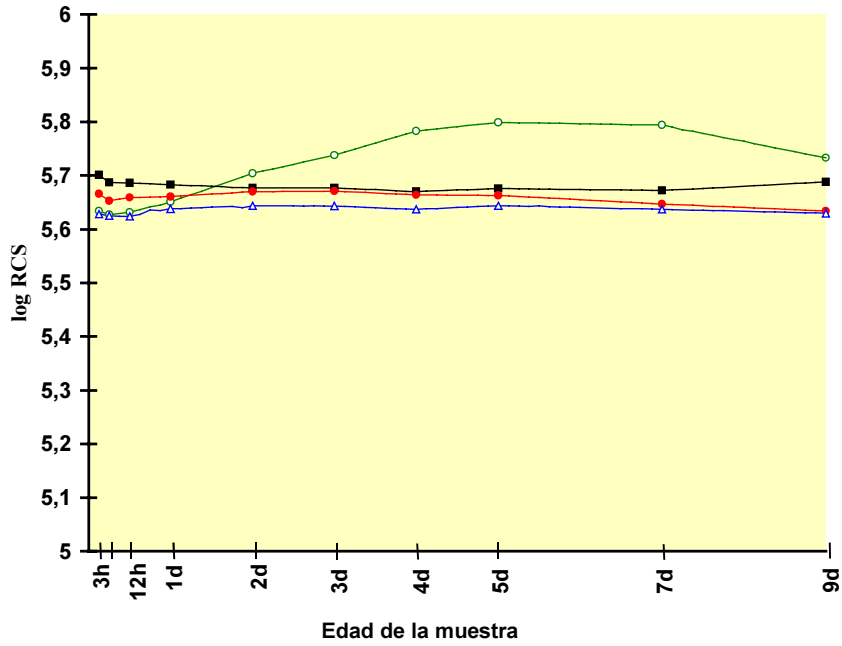
En la interacción edad x conservación x almacenamiento (Figura IV.9) se pudo evidenciar cómo, a temperatura de refrigeración, la leche conservada mostró una mayor homogeneidad y similitud de los valores de RCS que a temperatura ambiente durante los 9 días de envejecimiento de la muestra, debido, muy probablemente, a las condiciones de mayor integridad celular propiciada por la refrigeración. Por su parte, HEALD *et al.* (1977) demostraron que, en muestras de leche de vaca conservadas con dicromato potásico y almacenadas a temperatura ambiente, se originaba un incremento del 13% en el RCS después de 5 días de almacenamiento, hecho totalmente contrario al mostrado por nosotros en la Figura IV.9.

Igualmente, resulta muy interesante observar cómo, en el caso de leche refrigerada y sin conservante, los RCS comienzan a ser anormalmente elevados por encima del 2° día de edad de la muestra, lo que limita considerablemente el período de análisis en este tipo de muestras. Ello pudiera ser de aplicación en el caso de protocolos analíticos bacteriológicos que pretendan complementarse con la información del RCS. Para el caso del almacenamiento a temperatura ambiente, este período analítico útil que garantiza la calidad y fiabilidad del RCS sería solamente de 12 horas (Figura IV.9).

Por último, la interacción edad x conservación x temperatura de análisis (Figura IV.10) evidenció, de nuevo, un comportamiento diferente en las muestras conservadas frente a las no conservadas. Respecto a las primeras, se observa una evolución del RCS muy similar en la leche conservada con bronopol para ambos tipos de temperatura, así como una mayor proximidad del RCS de las muestras analizadas a

—○— Sin conservante —■— Bronopol —●— Dicromato potásico —▲— Azidiol

### REFRIGERACIÓN



### TEMPERATURA AMBIENTE

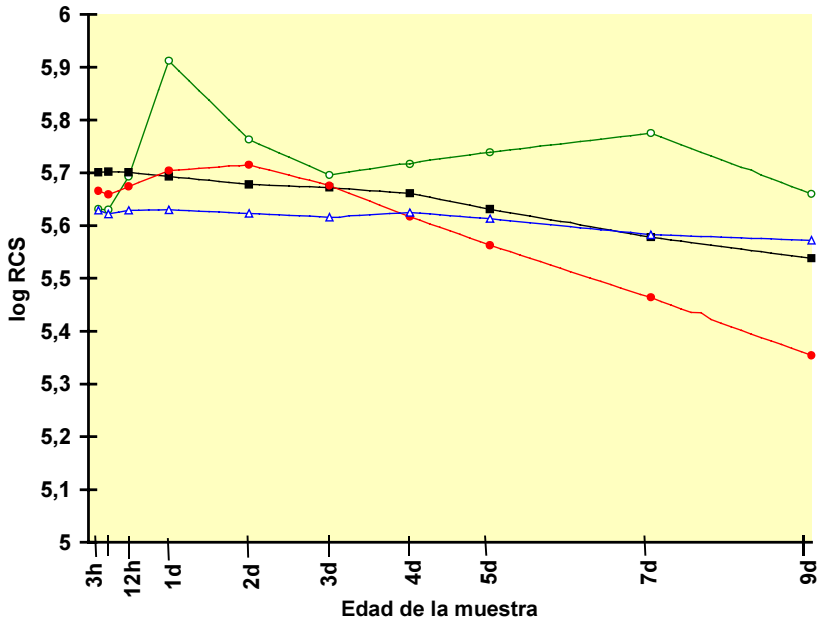


Figura IV.9. Efecto de la interacción edad x conservación x almacenamiento sobre el RCS analizado por el método FOE

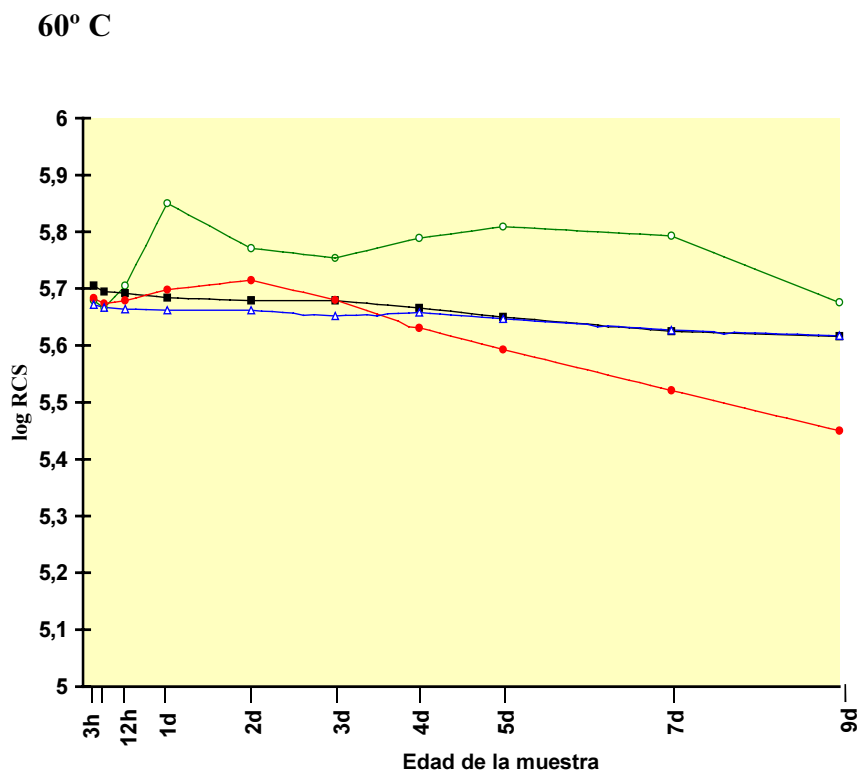
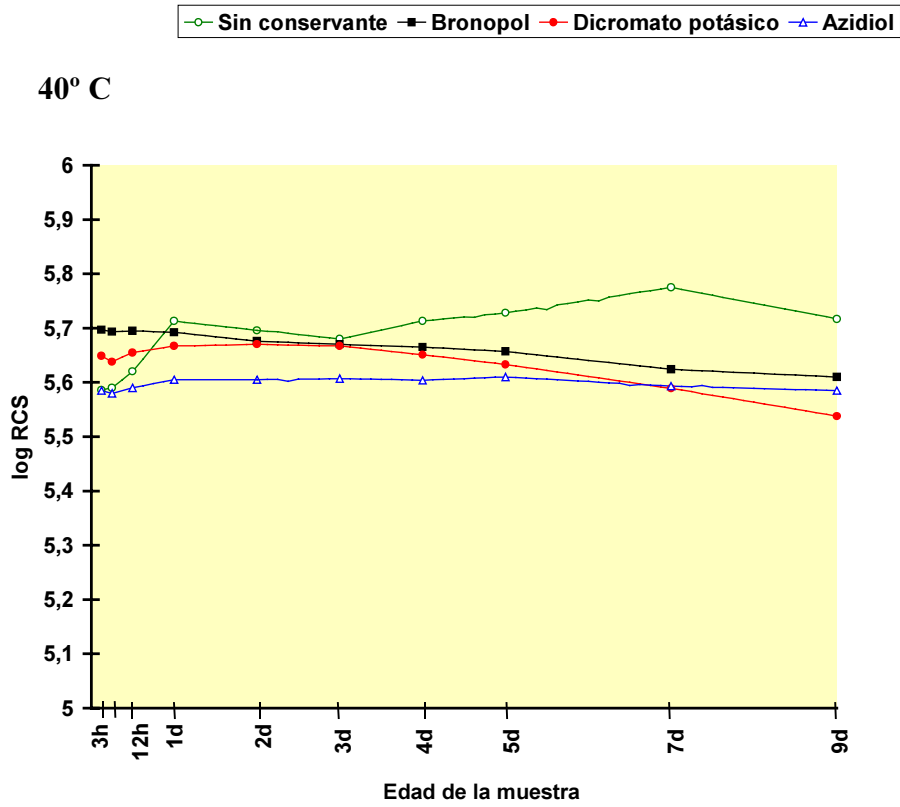


Figura IV.10. Efecto de la interacción edad x conservación x temperatura de análisis sobre el RCS analizado por el método FOE

60° C frente a las analizadas a 40° C, donde las diferencias de RCS en las muestras más recientes sobrepasaron, en algunos casos, una décima logarítmica (Figura IV.10). En efecto, los RCS de las muestras conservadas fueron más regulares a lo largo del período experimental, a excepción de las preservadas con dicromato potásico y analizadas a 60° C, en las cuales el RCS fue cayendo de forma más acusada que las conservadas con azidiol y bronopol.

El RCS de la leche sin conservante tuvo una evolución irregular y diferente al de las leches conservadas, especialmente cuando fue analizada a 60° C, que alcanzó a las 24 horas valores demasiado altos ( $708 \times 10^3$  cél./ml) en comparación con la leche conservada (rango: de  $459 \times 10^3$  a  $499 \times 10^3$  cél./ml).

En conjunto, estos resultados nos permiten evidenciar la eficiencia del método FOE, en términos de precisión y repetibilidad, en el análisis del RCS de la leche ovina, si bien un adecuado conocimiento de los factores de variación de este método, particularmente importantes en lo que se refiere a la temperatura de almacenamiento y conservante usado, resulta de gran interés para garantizar una calidad analítica óptima. Desde el punto de vista de los muestreos rutinarios del control lechero o de leche de tanque, utilizando como conservante el dicromato potásico y con una edad de la muestra inferior a 7 días, las variaciones inducidas por tales factores pudieran no revestir excesiva importancia para la determinación del estado sanitario de las ovejas, siempre y cuando las muestras sean refrigeradas tras su recogida. Sin embargo, la uniformidad de conservación, almacenamiento, edad y temperatura de análisis resulta obligada en el caso de los controles de calidad de los instrumentos y laboratorios, así como en la confección de patrones de RCS conocido.

## IV.2. EXPERIENCIA II:

Estudio del efecto de la congelación sobre el recuento de células somáticas estimado por el método fluoro-opto-electrónico y de la influencia de la conservación, edad de la muestra, tipo de descongelación y temperatura de análisis sobre el recuento celular de la leche de oveja almacenada a temperatura de congelación ( $-20^{\circ}\text{C}$ )

---

### IV.2.1. COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA REFRIGERACIÓN Y DE LA CONGELACIÓN EN FUNCIÓN DEL TIPO DE CONSERVACIÓN UTILIZADA Y DE LA TEMPERATURA DE ANÁLISIS

El análisis de varianza (Tabla IV.16) muestra que todos los factores analizados y sus interacciones tienen un efecto altamente significativo ( $p < 0,001$ ) sobre el RCS y que, concretamente, algunos de ellos, como, por ejemplo, el almacenamiento ( $F = 982$ ) y la interacción almacenamiento x temperatura de análisis ( $F = 1.019$ ), tienen tanta importancia como el factor oveja ( $F = 1.184$ ), mientras que la conservación ( $F = 259$ ), la temperatura de análisis ( $F = 167$ ) y las interacciones almacenamiento x conservación ( $F = 147$ ), conservación x temperatura de análisis ( $F = 6$ ) y almacenamiento x conservación x temperatura de análisis ( $F = 23$ ), aunque contribuyeron significativamente ( $p < 0,001$ ) a la variación de la variable en estudio, lo hicieron en menor magnitud que los dos efectos anteriores.

#### IV.2.1.1. ALMACENAMIENTO

El efecto del almacenamiento (Tabla IV.17) sobre el RCS ha puesto de manifiesto la existencia de diferencias altamente significativas ( $p < 0,001$ ) entre los RCS de leche refrigerada y los de leche descongelada. Los antilogaritmos de las medias de mínimos cuadrados, aproximadamente equivalentes a las medias

geométricas de los RCS, fueron de  $333 \times 10^3$  cél./ml, para la leche refrigerada, y de  $235 \times 10^3$  cél./ml, en el caso de la leche descongelada, lo cual supone una reducción media del RCS del 29% en el proceso de congelación, similar a la descrita, en términos de media aritmética, por GONZALO *et al.* (1993) en leche de oveja (28-34%), y por SCHMIDT-MADSEN (1975) en leche de vaca (30%), pero superior a la encontrada por BARKEMA *et al.* (1997) en leche de esta última especie (3,6-12%). A su vez, dicho porcentaje de descenso coincide con la reducción del RCS hallada por READ *et al.* (1969) mediante el método MD (19-29%) en la leche descongelada de vaca.

Según GONZALO *et al.* (1993), la observación microscópica de la intensidad tintorial de las células descongeladas permite inferir que esta reducción del RCS estaría ligada a una pérdida de afinidad cromática de los núcleos celulares descongelados, que limitaría la ganancia de los pulsos eléctricos nucleares, de ahí que resulte interesante conocer si dicha capacidad se ve estimulada o deprimida por el tipo de conservante o por la temperatura de análisis.

Tabla IV.16. ANOVA de los efectos de la refrigeración y de la congelación, considerando el tipo de conservación utilizada y la temperatura de análisis, sobre el RCS de leche de oveja (método FOE)

Fuentes de variación	gl	F
Oveja	69	1.184,2***
Almacenamiento	1	982,2***
Conservación	3	258,9***
Temperatura de análisis	1	167,1***
Almacenamiento x Temperatura de análisis	1	1.018,9***
Almacenamiento x Conservación	3	147,1***
Conservación x Temperatura de análisis	3	6,0***
Almacenamiento x Conservación x Temperatura de análisis	3	23,0***

gl: grados de libertad.

\*\*\*  $p < 0,001$ .

## IV.2. Experiencia II

Tabla IV.17. Efecto del almacenamiento sobre el RCS de la leche de oveja (método FOE)

Almacenamiento	MMC	ES	antilog MMC (x 10 <sup>3</sup> /ml)
Refrigeración	5,523 <sup>a</sup>	0,005	333
Congelación	5,371 <sup>b</sup>	0,002	235

ES: error estándar; MMC: media de mínimos cuadrados.

<sup>a,b</sup> Medias con letras distintas en la misma columna difieren  $p < 0,001$ .

### IV.2.1.2. INTERACCIONES

En la Tabla siguiente (IV.18) se muestra la interacción almacenamiento x temperatura de análisis sobre el RCS. En dicha Tabla se evidencia que no existen diferencias significativas de RCS entre muestras refrigeradas y congeladas, siempre que sean analizadas a 40° C, puesto que las analizadas a 60° C sí dan lugar a diferencias altamente significativas ( $p < 0,001$ ) a favor de las muestras refrigeradas. Adicionalmente, queda también de manifiesto que, en refrigeración, se obtienen mayores RCS a 60° C que a 40° C ( $p < 0,001$ ), hecho ya comprobado en la Experiencia I.

Tabla IV.18. Efecto de la interacción almacenamiento x temperatura de análisis sobre el RCS de la leche de oveja analizada con el método FOE

Temperatura de análisis	MMC		antilog MMC (x 10 <sup>3</sup> /ml)	
	Refrigeración	Congelación	Refrigeración	Congelación
40° C	5,477	5,480	300	302
60° C	5,569 <sup>a</sup>	5,262 <sup>b</sup>	371	183

MMC: media de mínimos cuadrados.

<sup>a,b</sup> Medias con letras distintas en la misma fila difieren  $p < 0,001$ .



En congelación, por el contrario, los RCS de muestras analizadas a 60° C decaen de forma altamente significativa ( $p < 0,001$ ) hasta valores muy imprecisos ( $183 \times 10^3$  cél./ml) y alejados del RCS real ( $339 \times 10^3$  cél./ml, Tabla IV.20), de tal forma que las muestras de leche descongeladas nunca deberían ser analizadas a 60° C. El mecanismo íntimo de acción que puede explicar este comportamiento permanece desconocido, si bien probablemente la suma de ambos efectos determine un gran deterioro de la capacidad de fijación cromática nuclear.

Por otra parte, este efecto resulta de gran interés al evidenciar que, bajo determinadas condiciones (40°C), los RCS de la leche descongelada son muy próximos a los de la leche refrigerada.

Tabla IV.19. Efecto de la interacción almacenamiento x conservación sobre el RCS de la leche de oveja analizada con el método FOE

Conservación	MMC		antilog MMC (x 10 <sup>3</sup> /ml)	
	Refrigeración	Congelación	Refrigeración	Congelación
<b>Bronopol</b>	5,558 <sup>a</sup>	5,482 <sup>b</sup>	361	303
<b>Dicromato potásico</b>	5,525 <sup>a</sup>	5,441 <sup>b</sup>	335	276
<b>Sin conservante</b>	5,506 <sup>a</sup>	5,385 <sup>b</sup>	321	243
<b>Azidiol</b>	5,502 <sup>a</sup>	5,176 <sup>b</sup>	318	150

MMC: media de mínimos cuadrados.

<sup>a,b</sup> Medias con letras distintas en la misma fila difieren  $p < 0,001$ .

La interacción almacenamiento x conservación se refleja en la Tabla IV.19. En ella se evidencia que se obtienen mayores ( $p < 0,001$ ) RCS en refrigeración que en congelación con los cuatro métodos de conservación. GONZALO *et al.* (1993) también hallaron diferencias significativas entre RCS de leche de oveja refrigerada y descongelada, conservada siempre con dicromato potásico, si bien estos autores encontraron descensos en torno al 25% en leche descongelada respecto a la

## IV.2. Experiencia II

refrigerada, mientras que nosotros, con ese mismo conservante, obtuvimos descensos del 18% de las medias geométricas. Por su parte, BARKEMA *et al.* (1997) también encontraron valores significativamente más bajos ( $p < 0,001$ ) del logaritmo neperiano del RCS después de la descongelación de la leche de vaca sin conservante, en pleno acuerdo con nuestros resultados. En consonancia con la Experiencia I, de los tres tipos de conservante empleados, tanto en congelación como en refrigeración, el bronopol proporcionó mayores RCS que el dicromato potásico ( $p < 0,01$ ) y que el azidiol ( $p < 0,01$ ).

Tabla IV.20. Efecto de la interacción almacenamiento x conservación x temperatura de análisis sobre el RCS de la leche de oveja analizada con el método FOE

	MMC		antilog MMC ( $\times 10^3/\text{ml}$ )	
	Refrigeración	Congelación	Refrigeración	Congelación
<b>40° C</b>				
Bronopol	5,530	5,547	<b>339</b>	<b>352</b>
Dicromato potásico	5,481 <sup>b</sup>	5,541 <sup>a</sup>	303	<b>348</b>
Sin conservante	5,440 <sup>b</sup>	5,515 <sup>a</sup>	275	<b>327</b>
Azidiol	5,456 <sup>a</sup>	5,316 <sup>b</sup>	286	207
<b>60° C</b>				
Bronopol	5,587 <sup>a</sup>	5,417 <sup>b</sup>	386	261
Dicromato potásico	5,568 <sup>a</sup>	5,340 <sup>b</sup>	370	219
Sin conservante	5,573 <sup>a</sup>	5,256 <sup>b</sup>	374	180
Azidiol	5,548 <sup>a</sup>	5,037 <sup>b</sup>	353	109

MMC: media de mínimos cuadrados.

<sup>a,b</sup> Medias con letras distintas en la misma fila difieren  $p < 0,001$ .

La interacción almacenamiento x conservación x temperatura de análisis viene reflejada en la Tabla IV.20, en la que lo más importante que cabría señalar es el hecho de que, tomando como valor más fiable el RCS de las muestras con bronopol, refrigeradas y analizadas a 40° C ( $339 \times 10^3$  cél./ml), existen tres condiciones de conservación en la congelación que proporcionan unos RCS muy similares a los de dicho valor ideal, siempre que la leche sea analizada a 40° C. Estos tres supuestos analíticos fueron las muestras sin conservante ( $327 \times 10^3$  cél./ml), con dicromato potásico ( $348 \times 10^3$  cél./ml) y con bronopol ( $352 \times 10^3$  cél./ml). Incluso con este último conservante, no aparecen diferencias significativas respecto a las mismas condiciones en refrigeración ( $339 \times 10^3$  cél./ml). En el resto de los casos, la congelación quedaría descartada como método de almacenamiento, debido a la drástica disminución originada en el RCS (desde el 23%, en el caso de muestras descongeladas, conservadas con bronopol y analizadas a 60° C, hasta el 68%, en el caso de muestras descongeladas, conservadas con azidiol y analizadas a 60° C).

Para finalizar, a efectos prácticos y de forma preliminar, estos resultados permiten concluir, por un lado, que la temperatura óptima de análisis de la leche descongelada es la de 40° C y, por otro, que nunca se deberían analizar muestras descongeladas que estuvieran conservadas con azidiol, aunque sí se podrían analizar las muestras descongeladas y conservadas con dicromato potásico o bronopol, o las descongeladas a las que no se hubiera añadido ningún conservante.

#### IV.2.2. ESTUDIO DE LA CONSERVACIÓN, EDAD DE LA LECHE, TIPO DE DESCONGELACIÓN Y TEMPERATURA DE ANÁLISIS SOBRE EL RECUENTO CELULAR DE MUESTRAS DE LECHE DE OVEJA MANTENIDAS A TEMPERATURA DE CONGELACIÓN

Para este estudio utilizamos un modelo en el que se incluyeron, además de la conservación y de la temperatura de análisis, ya considerados en el apartado anterior, la edad de la muestra y el tipo de descongelación, aunque, como ha quedado demostrado en el análisis de varianza (Tabla IV.21), su influencia sobre el RCS fue mucho menor ( $F = 4,4$  para la edad, y  $F = 105$  para el tipo de descongelación) que los dos primeros factores mencionados, los cuales tuvieron más importancia ( $F = 1.780$ , para el efecto conservación, y  $F = 4.569$ , para el efecto temperatura de análisis) que el factor oveja ( $F = 1.032$ ). De las interacciones dobles, tan sólo las interacciones tipo de descongelación x edad y conservación x edad no fueron significativas ( $p \geq 0,05$ ), mientras que, de las triples, exclusivamente tuvo significación estadística ( $p < 0,001$ ) la interacción temperatura de análisis x conservación x tipo de descongelación.

##### IV.2.2.1. TEMPERATURA DE ANÁLISIS

Al igual que señalamos en el epígrafe IV.2.1.2, en congelación se obtuvieron RCS significativamente ( $p < 0,001$ ) más elevados a  $40^{\circ}\text{C}$  ( $5,480$ ) que a  $60^{\circ}\text{C}$  ( $5,262$ ), siendo sus antilogaritmos  $302 \times 10^3$  y  $183 \times 10^3$  cél./ml, respectivamente, lo que indica un acusado descenso en los RCS obtenidos a  $60^{\circ}\text{C}$ . Estos resultados son contrapuestos a los obtenidos en condiciones de refrigeración, donde los RCS a  $60^{\circ}\text{C}$  son significativamente superiores ( $p < 0,001$ ) que a  $40^{\circ}\text{C}$ . Probablemente, la combinación derivada de la descongelación y del excesivo calentamiento suponga un traumatismo nuclear que deprima la captación del colorante y el RCS.

##### IV.2.2.2. CONSERVACIÓN

Como se evidencia en la Tabla IV.22, los mayores RCS en leche descongelada corresponden a las muestras que llevan bronopol, mientras que los menores se encuentran en las muestras conservadas con azidiol. Las diferencias halladas entre los

cuatro tipos de conservación son altamente significativas ( $p < 0,001$ ), si bien el descenso más marcado tiene lugar en el caso del azidiol, por lo que el empleo de dicho conservante se debería rechazar en muestras que fueran a ser congeladas.

Tabla IV.21. ANOVA del efecto de la conservación, edad de la leche, tipo de descongelación y temperatura de análisis sobre el RCS (método FOE) en muestras de leche de oveja mantenidas a temperatura de congelación

Fuentes de variación	gl	F
Oveja	69	1.032,2***
Temperatura de análisis	1	4.569,1***
Conservación	3	1.780,7***
Tipo de descongelación	1	105,0***
Edad de la leche	3	4,4**
Temperatura de análisis x Tipo de descongelación	1	129,4***
Temperatura de análisis x Conservación	3	109,0***
Temperatura de análisis x Edad de la leche	3	6,7***
Conservación x Tipo de descongelación	3	5,7***
Tipo de descongelación x Edad de la leche	3	2,5 <sup>NS</sup>
Conservación x Edad de la leche	9	1,3 <sup>NS</sup>
Temperatura de análisis x Conservación x Tipo de descongelación	3	9,3***
Temperatura de análisis x Tipo de descongelación x Edad de la leche	3	1,4 <sup>NS</sup>
Conservación x Tipo de descongelación x Edad de la leche	9	0,5 <sup>NS</sup>
Temperatura de análisis x Conservación x Edad de la leche	9	0,5 <sup>NS</sup>

**gl:** grados de libertad.

\*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; <sup>NS</sup> no significativo ( $P \geq 0,05$ ).

## IV.2. Experiencia II

Tabla IV.22. Efecto de la conservación sobre el RCS de la leche descongelada de oveja analizada con el método FOE

Conservación	MMC	ES	antilog MMC (x 10 <sup>3</sup> /ml)
Bronopol	5,482 <sup>a</sup>	0,003	303
Dicromato potásico	5,440 <sup>b</sup>	0,003	275
Sin conservante	5,386 <sup>c</sup>	0,003	243
Azidiol	5,176 <sup>d</sup>	0,003	150

ES: error estándar; MMC: media de mínimos cuadrados.

<sup>a,b,c,d</sup> Medias con letras distintas en la misma columna difieren  $p < 0,001$ .

### IV.2.2.3. TIPO DE DESCONGELACIÓN

El efecto del tipo de descongelación es presentado en la Tabla IV.23, donde se muestra que, a pesar de obtener diferencias significativas entre la descongelación rápida y la lenta, los RCS derivados de una descongelación rápida no superaron en más del 7% a los RCS obtenidos tras una descongelación lenta.

Tabla IV.23. Efecto del tipo de descongelación sobre el recuento celular de la leche descongelada de oveja analizada con el método FOE

Tipo de descongelación	MMC	ES	antilog MMC (x 10 <sup>3</sup> /ml)
Rápida	5,388 <sup>a</sup>	0,002	244
Lenta	5,355 <sup>b</sup>	0,002	226

ES: error estándar; MMC: media de mínimos cuadrados.

<sup>a,b</sup> Medias con letras distintas en la misma columna difieren  $p < 0,001$ .

## IV.2.2.4. EDAD

La Tabla IV.24 refleja la evolución del RCS con la edad de la leche, siendo de destacar que, a diferencia de lo que ocurría en la refrigeración, aquí prácticamente no hay diferencias en el RCS a lo largo de los 60 días de período experimental. Si bien el día 30 la leche presenta un RCS significativamente ( $p < 0,01$ ) mayor que el resto, el aumento real, en términos de medias geométricas, no supone más de un 3%. En este sentido, estos resultados son contradictorios con los referidos por GONZALO *et al.* (1993), que señalaron que el efecto de la edad en muestras congeladas no era homogéneo, mientras que BARKEMA *et al.* (1997), en leche de vaca, hallaron un descenso mayor en el RCS cuanto más tiempo permanecía congelada ( $-20^{\circ}$  C) la muestra a lo largo de 28 días.

Tabla IV.24. Efecto de la edad de la leche sobre el RCS de la leche descongelada de oveja analizada con el método FOE

Edad de la leche	MMC	ES	antilog MMC (x $10^3$ /ml)
1 día	5,369 <sup>b</sup>	0,003	234
15 días	5,366 <sup>b</sup>	0,003	232
30 días	5,381 <sup>a</sup>	0,003	240
60 días	5,368 <sup>b</sup>	0,003	233

ES: error estándar; MMC: media de mínimos cuadrados.

<sup>a,b</sup> Medias con letras distintas en la misma columna difieren  $p < 0,01$ .

## IV.2.2.5. INTERACCIONES

Los efectos de la interacción temperatura de análisis x tipo de descongelación se pueden ver en la Tabla IV.25, observándose cómo las muestras analizadas a  $40^{\circ}$  C dan lugar a RCS muy similares en ambos tipos de descongelación. No sucede lo

## IV.2. Experiencia II

mismo a 60° C, donde sí aparecen diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) en favor de la descongelación rápida y donde se muestran, de nuevo, RCS muy inferiores ( $p < 0,001$ ) a los hallados a 40° C. Estos resultados contradicen la hipótesis de BARKEMA *et al.* (1997), según la cual, el tipo de descongelación parece que afecta al RCS de la leche de vaca.

Tabla IV.25. Efecto de la interacción temperatura de análisis x tipo de descongelación sobre el RCS de la leche descongelada de oveja analizada con el método FOE

Temperatura de análisis	MMC		antilog MMC (x 10 <sup>3</sup> /ml)	
	Lenta	Rápida	Lenta	Rápida
40° C	5,482	5,478	303	301
60° C	5,228 <sup>b</sup>	5,297 <sup>a</sup>	169	198

MMC: medias de mínimos cuadrados.

<sup>a,b</sup> Medias con letras distintas en la misma fila difieren  $p < 0,001$ .

Como puede observarse en la Figura IV.11, la evolución de los RCS en función de la edad de la muestra y de la temperatura de análisis evidencia que el RCS se mantuvo prácticamente constante a ambas temperaturas, aunque siempre con valores significativamente mayores ( $p < 0,001$ ) a 40° C que a 60° C, de forma contraria a como ocurría en refrigeración (epígrafe IV.1.3.5) y a lo hallado por MILLER *et al.* (1986).

Por otra parte, en la Tabla IV.26 se pueden observar los efectos resultantes de la interacción temperatura de análisis x conservación. Este efecto contribuyó, de forma significativa, a la variación del RCS en todos los tipos de conservación. Lo más evidente es el pronunciado descenso del RCS en las muestras analizadas a 60° C, el cual nunca es inferior al 26%, y que, en el caso de las muestras con azidiol, llega al 47%, en términos de media geométrica.



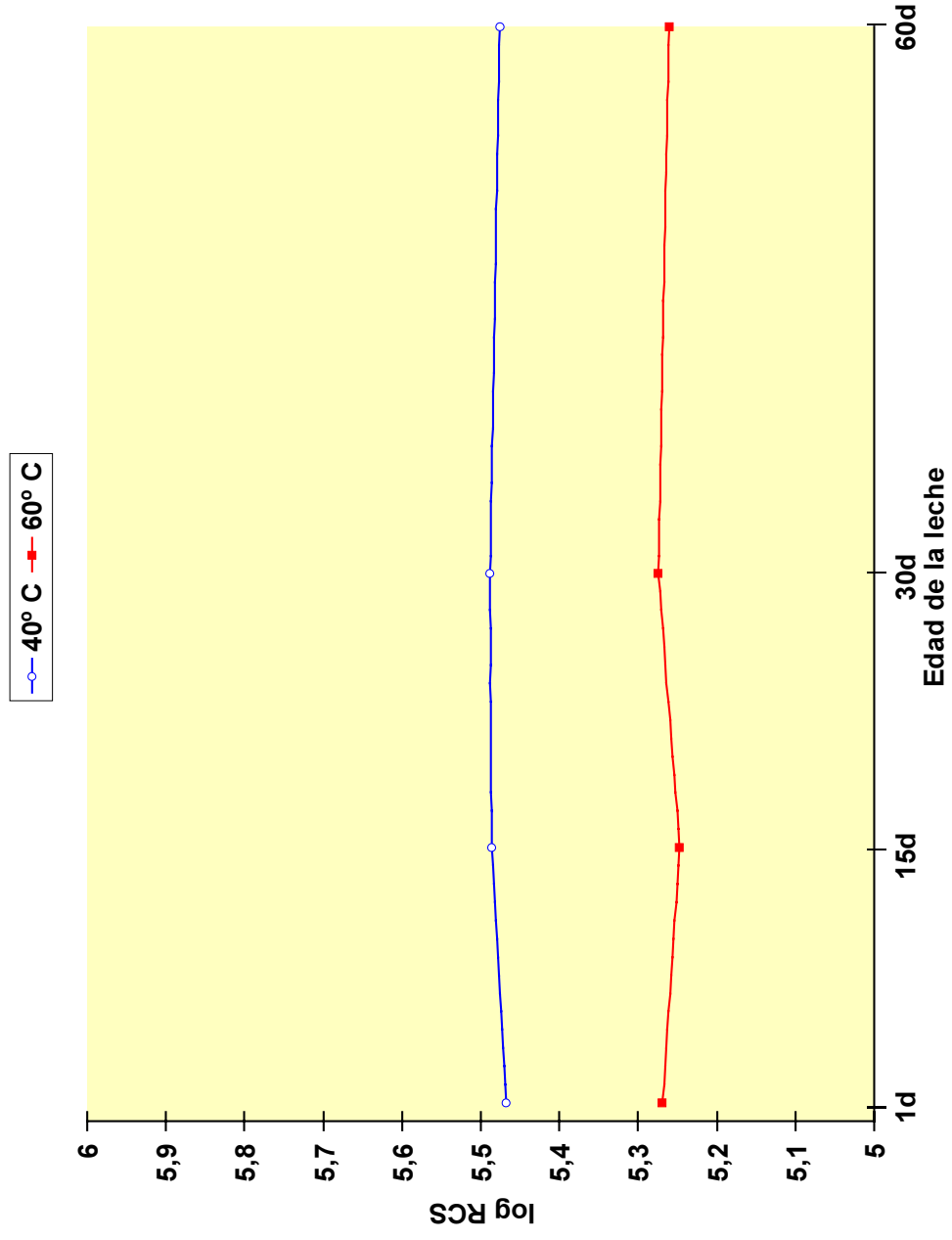


Figura. IV.11. Evolución del RCS de leche de oveja descongelada en función de la temperatura de análisis y analizada por el método FOE

*IV.2. Experiencia II*

Tabla IV.26. Efecto de la interacción temperatura de análisis x conservación sobre el RCS de la leche descongelada de oveja analizada con el método FOE

Conservación	MMC		antilog MMC (x 10 <sup>3</sup> /ml)	
	40° C	60° C	40° C	60° C
<b>Bronopol</b>	5,547 <sup>a</sup>	5,417 <sup>b</sup>	352	261
<b>Dicromato potásico</b>	5,541 <sup>a</sup>	5,340 <sup>b</sup>	348	219
<b>Sin conservante</b>	5,515 <sup>a</sup>	5,256 <sup>b</sup>	327	180
<b>Azidiol</b>	5,316 <sup>a</sup>	5,037 <sup>b</sup>	207	109

MMC: media de mínimos cuadrados.

<sup>a,b</sup> Medias con letras distintas en la misma fila difieren  $p < 0,001$ .

Tabla IV.27. Efecto de la interacción conservación x tipo de descongelación sobre el RCS de la leche descongelada de oveja analizada con el método FOE

Conservación	MMC		antilog MMC (x 10 <sup>3</sup> /ml)	
	Lenta	Rápida	Lenta	Rápida
<b>Bronopol</b>	5,466 <sup>b</sup>	5,498 <sup>a</sup>	292	315
<b>Dicromato potásico</b>	5,435	5,446	272	279
<b>Sin conservante</b>	5,362 <sup>b</sup>	5,409 <sup>a</sup>	230	256
<b>Azidiol</b>	5,156 <sup>b</sup>	5,197 <sup>a</sup>	143	157

MMC: media de mínimos cuadrados.

<sup>a,b</sup> Medias con letras distintas en la misma fila difieren  $p < 0,001$ .

La interacción conservación x tipo de descongelación se representa en la Tabla IV.27, pudiendo apreciarse que, con la excepción de las muestras con dicromato potásico, hubo diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) entre las muestras descongeladas lentamente y las descongeladas de forma rápida con los otros tres tipos de conservación, proporcionando la descongelación rápida mayores RCS que la lenta, aunque nunca superiores a un 10% en términos de media geométrica.

Tabla IV.28. Efecto de la interacción temperatura de análisis x conservación x tipo de descongelación sobre el RCS de la leche descongelada de oveja analizada con el método FOE

	MMC		antilog MMC (x 10 <sup>3</sup> /ml)	
	Lenta	Rápida	Lenta	Rápida
<b>40° C</b>				
Bronopol	5,545	5,548	351	353
Dicromato potásico	5,542	5,540	348	347
Sin conservante	5,514	5,516	327	328
Azidiol	5,325 <sup>a</sup>	5,307 <sup>b</sup>	211	203
<b>60° C</b>				
Bronopol	5,386 <sup>b</sup>	5,448 <sup>a</sup>	243	281
Dicromato potásico	5,327 <sup>b</sup>	5,352 <sup>a</sup>	212	225
Sin conservante	5,210 <sup>b</sup>	5,302 <sup>a</sup>	162	200
Azidiol	4,987 <sup>b</sup>	5,086 <sup>a</sup>	97	122

MMC: media de mínimos cuadrados.

<sup>a,b</sup> Medias con letras distintas en la misma fila difieren  $p < 0,05$ .

Aunque las diferencias no son muy pronunciadas, este efecto permitiría, en principio, decantarnos por el tipo de descongelación rápida, que es el que ofrece mayores RCS. Sin embargo, el estudio de la interacción temperatura de análisis x conservación x tipo de descongelación permite clarificar completamente lo ocurrido, haciendo comparables ambos tipos de descongelación a 40° C.

En efecto, esta última interacción, mostrada en la Tabla IV.28, evidencia como más destacable que, en las muestras sin conservante, con dicromato potásico o con bronopol, no existen diferencias significativas entre los RCS de muestras descongeladas de forma lenta y los de muestras descongeladas por un procedimiento rápido, siempre que sean analizadas a 40° C. Además, en estas circunstancias se encontraron siempre los mayores RCS, compatibles con altas tasas de precisión ( $327-353 \times 10^3$  cél./ml). En el resto de condiciones, la descongelación rápida dio lugar, en la mayor parte de los casos, a RCS significativamente ( $p < 0,05$ ) más elevados que la lenta, pero significativamente más bajos ( $p < 0,001$ ) que los especificados anteriormente.

### IV.2.3. EXACTITUD, CORRELACIÓN, COMPONENTES DE VARIANZA Y REPETIBILIDADES ENTRE LOS RECuentOS OBTENIDOS EN LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE ANÁLISIS

Según los resultados obtenidos hasta ahora y, más concretamente, aquéllos reseñados en las Tablas IV.20 y 28, la leche congelada que posteriormente ha sufrido descongelación, independientemente del tipo de la misma, analizada a 40° C y no conservada, o conservada con bronopol, o con dicromato potásico, da lugar a RCS bastante exactos, es decir, con valores próximos a los RCS obtenidos en las condiciones analíticas ideales (leche refrigerada, conservada con bronopol y analizada a las 24 horas posrecogida a 40° C), demostradas en la Experiencia I.

Sin embargo, considerar la exactitud no sería suficiente para valorar el efecto de la congelación, pues habría que evaluar también las correlaciones establecidas entre las diferentes condiciones analíticas, así como los componentes de varianza y las repetibilidades en dichas condiciones concretas. Dado que la edad de la muestra y el tipo de descongelación tienen, en la práctica, una influencia escasa sobre el RCS (epígrafe IV.2.2), hemos estudiado estos aspectos únicamente en leche descongelada

de forma rápida, en el momento central del período de congelación (día 30 posrecogida), analizada a 40° C y con los cuatro tipos de conservación.

En este sentido, los coeficientes de correlación (Tabla IV.29) fueron establecidos entre estas condiciones mencionadas y la leche analizada en condiciones ideales (refrigerada, con bronopol y analizada a 40° C a las 24 horas posrecogida), obteniéndose correlaciones muy altas en el caso de la leche descongelada sin conservante (0,984), con bronopol (0,989) y con dicromato potásico (0,990), aunque inferiores con el azidiol (0,836).

Tabla IV.29. Coeficientes de correlación entre los RCS en condiciones ideales y los de leche descongelada en las condiciones de estudio

	TR-BR-40
TC-SC-40	0,984
TC-DP-40	0,990
TC-BR-40	0,989
TC-AZ-40	0,836

40: análisis a 40° C; AZ: azidiol; BR: bronopol; DP: dicromato potásico; SC: sin conservante; TC: temperatura de congelación; TR: temperatura de refrigeración.

En efecto, la Figura IV.12 representa la recta de regresión establecida en el caso de muestras descongeladas y adicionadas con dicromato potásico frente a las muestras refrigeradas y analizadas en las condiciones óptimas de RCS, entre las que se establece un coeficiente de correlación de 0,990. Esta recta permite deducir directamente la validez de la congelación, a efectos de RCS, bajo las condiciones antedichas, dada la práctica superposición de la línea de regresión y la línea de los 45° y el elevado valor del coeficiente de determinación ( $r^2 = 0,980$ ).

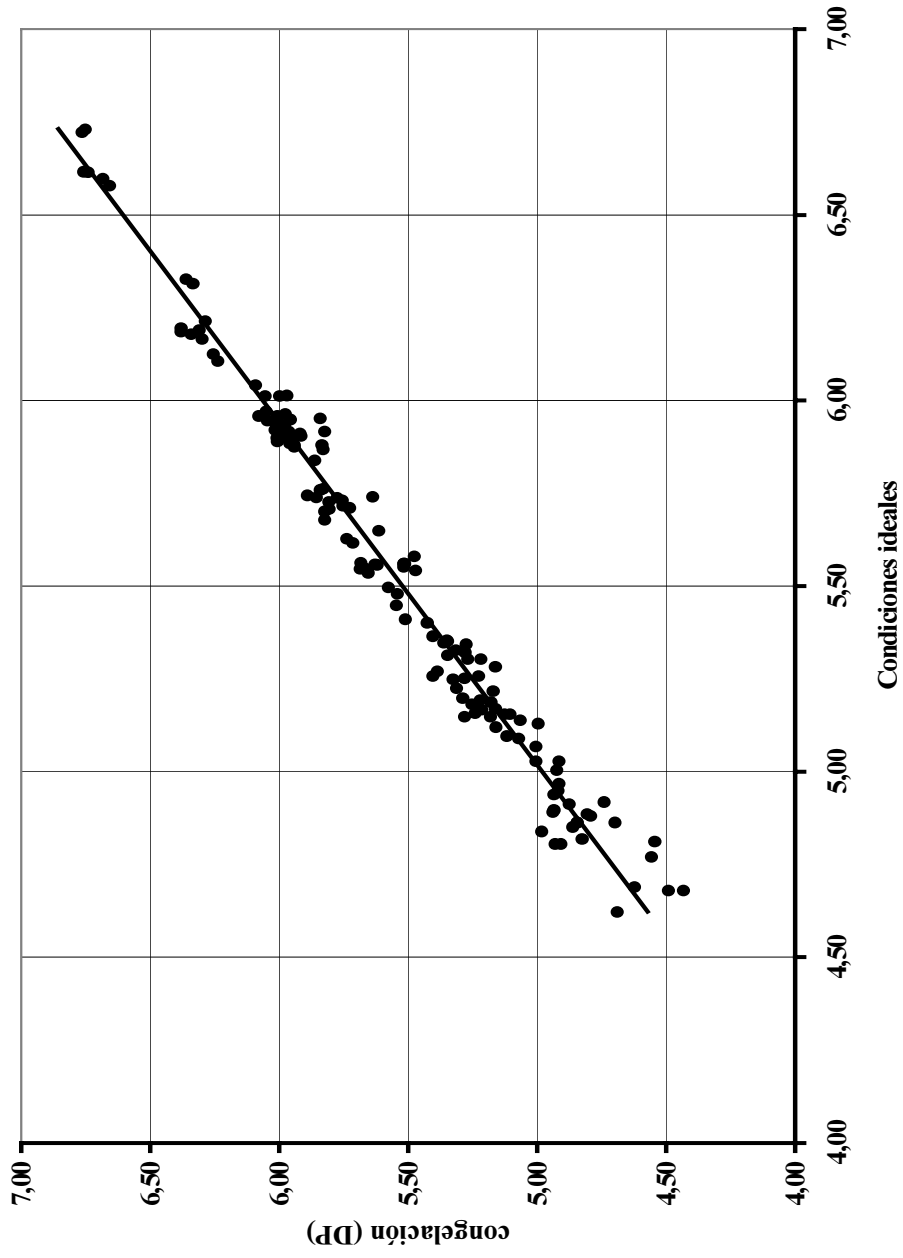


Figura IV.12. Recta de regresión entre los RCS en condiciones ideales y los de leche descongela-  
da conservada con dicromato potásico (DP)

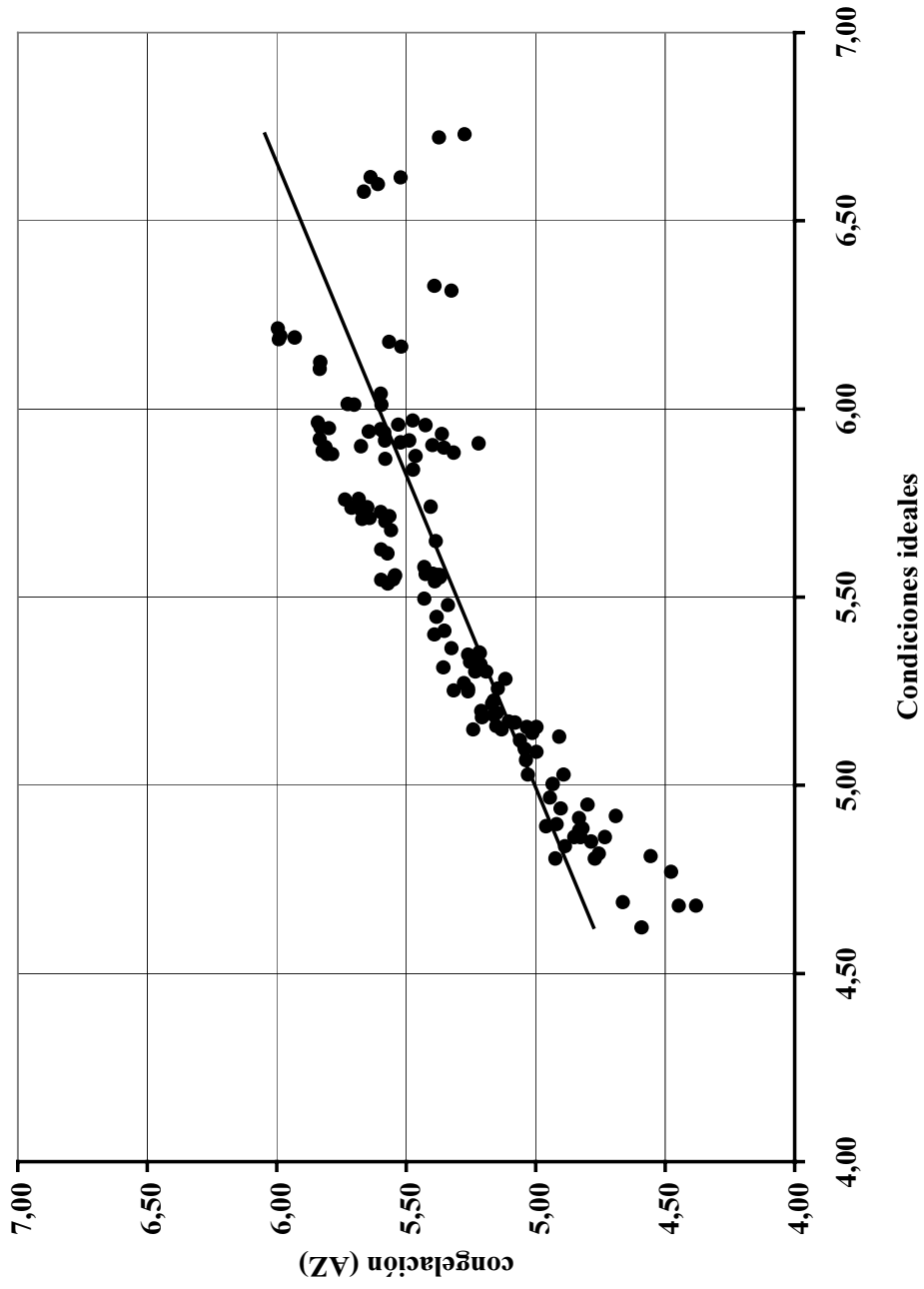


Figura IV.13. Recta de regresión entre los RCS en condiciones ideales y los de leche descongelada conservada con azidiol (AZ)

## IV.2. Experiencia II

---

Por su parte, la recta de regresión entre la leche refrigerada y la congelada y preservada con azidiol (Figura IV.13) evidencia mucho peores condiciones de mantenimiento de la integridad celular en el caso de utilizar este último conservante.

Por lo que respecta a las varianzas residuales, como parámetros evaluadores de la variabilidad del RCS entre réplicas (Tabla IV.30), las encontradas en la leche refrigerada (0,000631) y en los casos de leche descongelada sin conservante (0,000904), con dicromato potásico (0,000923) y con bronopol (0,000973) fueron muy similares o del mismo orden, si bien el valor más bajo correspondió a la leche refrigerada. No obstante, en la leche descongelada y conservada con azidiol, la varianza entre réplicas aumentó drásticamente (0,001064). En esta misma tabla también se reflejan los valores de F, correspondiendo el valor más alto (758) a la leche refrigerada, mientras que el más bajo fue el de la leche descongelada y conservada con azidiol (234), en consonancia con los resultados anteriores. Asimismo, la repetibilidad fue alta en todos los casos (0,991-0,997), al igual que en la Experiencia I, donde ya habíamos visto que la importancia del efecto *oveja* enmascararía las posibles diferencias de repetibilidad entre réplicas, por lo que este parámetro debe ser interpretado con precaución y a la vista del estudio global.

Tabla IV.30. Valores F del *factor oveja*, varianzas residuales, repetibilidades y errores estándar de los RCS, obtenidos mediante el método FOE, de leche de oveja en condiciones ideales y en la leche descongelada en las condiciones óptimas

	<b>Valor F</b>	<b>Varianza residual</b>	<b>Repetibilidad</b>	<b>ES</b>
<b>TR-BR-40</b>	758,052	0,000631	0,997	0,001
<b>TC-SC-40</b>	540,383	0,000904	0,996	0,001
<b>TC-DP-40</b>	621,278	0,000923	0,997	0,001
<b>TC-BR-40</b>	579,896	0,000973	0,997	0,001
<b>TC-AZ-40</b>	233,773	0,001064	0,991	0,002

**40:** análisis a 40° C; **AZ:** azidiol; **BR:** bronopol; **DP:** dicromato potásico; **ES:** error estándar; **SC:** sin conservante; **TC:** temperatura de congelación; **TR:** temperatura de refrigeración.



De todos estos resultados, podemos concluir que la leche congelada el mismo día de recogida y analizada por el método FOE a 40° C da lugar a RCS bastante exactos, repetibles y estrechamente correlacionados con los de la leche refrigerada en condiciones ideales, siempre que el tipo de conservación sea sin conservante, con dicromato potásico o con bronopol, que son las únicas condiciones del estudio que garantizan una auténtica calidad del resultado de RCS. Nunca se debería congelar leche conservada con azidiol para la obtención del RCS por el método FOE.



## V. CONCLUSIONES



## PRIMERA

En la leche de oveja, el método microscópico de referencia con la tinción azul de metileno, recomendado por la Federación Internacional de Lechería para leche de vaca, podría considerarse un método aceptable de recuento. Sin embargo, tinciones más específicas, como la de May-Grünwald-Giemsa y la pironina Y-verde de metilo, mejoran los rendimientos del método, al presentar una menor varianza residual entre réplicas de la misma muestra. Debido al alto extracto seco de la leche de oveja, la utilización de portaobjetos tratados con poli-L-lisina, con el fin de aumentar la adherencia de la película de leche, resulta altamente recomendable, particularmente en el caso de la tinción azul de metileno, donde el desprendimiento de la misma se produce con relativa frecuencia.

## SEGUNDA

En la leche de oveja hay una presencia constante, aunque de baja concentración, de partículas citoplasmáticas. Su diferenciación se encuentra especialmente facilitada con la tinción pironina Y-verde de metilo. La utilización de azul de metileno o de May-Grünwald-Giemsa, como colorantes, precisa de personal entrenado en el recuento microscópico para diferenciar las células de las partículas citoplasmáticas.

## TERCERA

El método fluoro-opto-electrónico se ha mostrado como un sistema preciso y repetible para el recuento de células somáticas en la leche de oveja, superando, incluso, al microscópico de referencia. Sin embargo, su calidad analítica únicamente puede garantizarse mediante la utilización rutinaria de patrones estándar de recuento conocido, que garanticen una adecuada calibración del aparato utilizado.

---

## CUARTA

Para el análisis del contenido celular por el método fluoro-opto-electrónico, la leche de oveja debe ser siempre conservada y almacenada a temperatura de refrigeración después de su recogida. La leche refrigerada pero sin conservante debe ser analizada dentro de las primeras 48 horas posrecogida. La mayor precisión y repetibilidad se producen en la leche preservada con bronopol y analizada a 40° C. En caso de utilizar otro conservante, la precisión mejora ligeramente a una temperatura de análisis de 60° C. La edad óptima de análisis en la leche es menor o igual a 5 días.

## QUINTA

La congelación de muestras de leche de oveja el mismo día de su recogida, con el fin de realizar con posterioridad su recuento celular por el método fluoro-opto-electrónico, es factible siempre que, con independencia del tipo de descongelación, se analicen a 40° C. La preservación de la leche no sería, en este caso, necesaria, si bien pueden usarse el bronopol y el dicromato potásico como conservantes. No se deben congelar nunca muestras de leche que hayan sido preservadas con azidiol.

## SEXTA

Bajo las metodologías rutinarias de recogida de muestras y de su envío al laboratorio (control lechero, leche de tanque, etc.), las diferencias inducidas por los factores de variación estudiados podrían no ser demasiado importantes, siempre y cuando se utilicen procedimientos muestrales y analíticos correctos; sin embargo, tales variaciones son de especial interés en el control de calidad intra e interlaboratorios.

## VI. RESUMEN





En la presente Memoria de Tesis Doctoral, se estudia la validez del método FOE para la determinación del RCS en la leche de oveja, a la vez que se definen las condiciones óptimas, tanto analíticas como de conservación y almacenamiento de las muestras, para su utilización rutinaria en la leche de esta especie. Para ello se llevaron a cabo dos experiencias distintas. En la primera se contrastó el método FOE frente al método MD de referencia, con tres tinciones diferentes (AM, MGG y PVM), al mismo tiempo que se analizó la influencia del tipo de conservación, la temperatura de almacenamiento, la edad de la muestra de leche y la temperatura de análisis sobre el RCS de la leche. Con este fin, se recogieron 80 muestras de leche individual de oveja, cada una de las cuales se dividió en 80 alícuotas, que se sometieron a distintas condiciones, resultantes de combinar entre sí 4 condiciones de conservación (sin conservante, dicromato potásico, azidiol y bronopol), 2 temperaturas de almacenamiento (temperatura ambiente y de refrigeración) y 10 edades diferentes (3 h, 6h, 12h, 1d, 2d, 3d, 4d, 5d, 7d y 9d). Cada alícuota fue analizada por duplicado, mediante el método FOE, a dos temperaturas analíticas (40 y 60°C). A su vez, a partir de cada muestra original se determinó el RCS mediante el método MD de referencia, utilizando las tres tinciones antes mencionadas, todas ellas por duplicado.

En la leche de esta especie, el método MD de referencia con la tinción AM, tal y como recomienda la Federación Internacional de Lechería en leche de vaca, puede considerarse como aceptable, si bien tinciones más específicas, como la de MGG y la PVM, mejoraron la repetibilidad del método oficial, al presentar una menor varianza residual entre réplicas de la misma muestra. La precisión no fue sustancialmente alterada por el colorante utilizado, sino por las condiciones analíticas y de conservación. Debido al alto extracto seco de la leche de oveja, la utilización de portaobjetos tratados con poli-L-lisina, con el fin de aumentar la adherencia de la película de leche, resultó muy recomendable en todos los casos, pero especialmente

---

en el caso de la tinción con AM, donde el desprendimiento de la misma se produce con relativa frecuencia. Igualmente, pudo demostrarse una presencia constante de PC en la leche de oveja, si bien su concentración media ( $14-17 \times 10^3/\text{ml}$ ) fue reducida y no pareció afectar a la precisión de los métodos MD.

Dentro del método FOE, la conservación, la temperatura de análisis, la edad de la muestra de leche, el tipo de almacenamiento y la mayoría de las interacciones dobles y triples incidieron muy significativamente ( $p < 0,001$ ) sobre el RCS de la leche de oveja. La mayor precisión y la mayor repetibilidad se produjeron en la leche preservada con bronopol y analizada a  $40^\circ\text{C}$  ( $475 \times 10^3/\text{ml}$ ). Los valores más elevados correspondieron a la leche con bronopol ( $467 \times 10^3/\text{ml}$ ), seguidos por los conservantes dicromato potásico ( $431 \times 10^3/\text{ml}$ ) y azidiol ( $422 \times 10^3/\text{ml}$ ). Sin embargo, RCS falsamente elevados fueron obtenidos en la leche no preservada ( $520 \times 10^3/\text{ml}$ ), en la que la proliferación bacteriana alteró sustancialmente el RCS, particularmente a la temperatura de análisis de  $60^\circ\text{C}$  ( $561 \times 10^3/\text{ml}$ ). Asimismo, los RCS a la temperatura analítica de  $60^\circ\text{C}$  ( $474 \times 10^3/\text{ml}$ ) fueron superiores a los obtenidos a  $40^\circ\text{C}$  ( $442 \times 10^3/\text{ml}$ ). El efecto del modo de almacenamiento de la leche se tradujo, igualmente, en variaciones del RCS entre  $469 \times 10^3/\text{ml}$  (refrigeración) y  $447 \times 10^3/\text{ml}$  (temperatura ambiente). La caída del RCS con la edad de la leche a lo largo del período de análisis fue del 20%. En conjunto, estos resultados aconsejan la conservación y la refrigeración de la leche después de su recogida, siendo la edad óptima de análisis, bajo estas condiciones, menor o igual a 5 días; sin embargo, la leche refrigerada pero sin conservante no debería ser analizada más allá de las 48 h posrecogida.

En la segunda experiencia se realizó el estudio del efecto de la congelación sobre el RCS estimado por el método FOE y, particularmente, de la influencia del conservante, tipo de descongelación, edad de la muestra y temperatura de análisis sobre dicha variable. Con este fin, 70 muestras individuales de leche fueron repartidas en 68 alícuotas, las cuales fueron divididas en 4 bloques de 17 alícuotas cada uno, correspondientes a los mismos tipos de conservación que los de la experiencia anterior. De cada grupo de 17 alícuotas, una se conservó a temperatura de refrigeración ( $4^\circ\text{C}$ ), y las 16 restantes fueron congeladas a  $-20^\circ\text{C}$ . Las alícuotas refrigeradas se analizaron por duplicado a las 24 h, tanto a  $40$  como a  $60^\circ\text{C}$ , mientras que las congeladas se dividieron en 4 lotes de 4 alícuotas para ser analizadas a las edades de 1, 15, 30 y 60 días. Para cada edad se procedió a realizar dos tipos de

descongelación: lenta y rápida. Dos de las 4 alícuotas de cada lote de edad siguieron una descongelación lenta, analizándose por duplicado a 40 y a 60°C, mientras que las otras 2 restantes fueron descongeladas de forma rápida e, igualmente, analizadas por duplicado a dichas temperaturas.

El efecto de la temperatura de almacenamiento evidenció la existencia de diferencias muy significativas ( $p < 0,001$ ) entre los RCS de la leche refrigerada ( $333 \times 10^3/\text{ml}$ ) y los de la leche descongelada ( $235 \times 10^3/\text{ml}$ ). Este descenso del RCS en la congelación se produjo, especialmente, en las muestras conservadas con azidiol ( $150 \times 10^3/\text{ml}$ ) y en la temperatura analítica de 60°C ( $183 \times 10^3/\text{ml}$ ), de manera que, exceptuando estas condiciones desfavorables, los RCS de la leche descongelada ( $327-352 \times 10^3/\text{ml}$ ) no fueron muy diferentes a los de la refrigeración ( $275-339 \times 10^3/\text{ml}$ ), que, en este caso, actuaron como referentes. De igual modo, las varianzas residuales de las muestras congeladas fueron similares a las de la leche refrigerada, y los coeficientes de correlación resultaron ser muy elevados. Finalmente, el estudio de los factores de variación del RCS permitió definir las condiciones analíticas y de preservación óptimas para la determinación del RCS de la leche descongelada mediante el método FOE.



## VII. SUMMARY



In this Ph.D. memory we study the validity of the fluoro-opto-electronic (FOE) method for somatic cell count (SCC) determination in sheep milk. For its daily use in the milk of this species, it is also determined the optimum conditions for analysis, preservation and storage of samples. For this purpose we performed two kind of experiments. In the first one, we compared the FOE and the reference direct microscopic (DM) methods, with three different stains: methylene blue (MB), May-Grünwald-Giemsa (MGG) and pyronin Y-methyl green (PMG). It was also analyzed the influence of preservation conditions, storage temperature, milk age and analysis temperature on milk SCC. Thus, we obtained 80 samples from different ewes. Each of them was divided in eighty aliquotes which were analyzed under the different conditions resulting from the combination of the following parameters: 4 preservation conditions (without preservative, potassium dichromate, azidiol and broponol), 2 preservation temperatures (room temperature and refrigeration) and 10 ages (3 h, 6 h, 12 h, 1 d, 2 d, 3 d, 4 d, 5 d, 7 d and 9 d). Duplicates were analyzed by the FOE method at two analytical temperatures (40 and 60°C). Simultaneously, duplicates were studied by the reference DM method for SCC, using the aforementioned stains.

In sheep milk, the reference DM method with the MB stain (as it is recommended by the International Dairy Federation in cow milk) can be considered as acceptable. Nevertheless, more specific stains, like MGG and PMG, improved the repeatability of the official method, because showed an smaller residual variance among replicates from the same sample. Precision was influenced by analytical and preservation conditions, but not by staining. It was highly advisable the use of poly-L-lysine to increase adherence of the milk film to the slide, given the high dry extract content of sheep milk, and particularly for the MB stain, in which it was frequent the release of the milk. It was also observed the constant presence of cytoplasmic

---

particles in sheep milk, although the average concentration ( $14-17 \times 10^3$  cel./ml) was small and it did not seem to affect the DM method precision.

Preservation, analysis temperature, sample age, storage, and most of double and triple interactions markedly affected ( $p < 0.001$ ) the sheep milk SCC by the FOE method. Increased precision and repeatability was obtained with bronopol preservation and  $40^\circ\text{C}$  analysis ( $475 \times 10^3$  cel./ml). Higher values were observed in milk with bronopol ( $467 \times 10^3$  cel./ml), followed by potassium dichromate ( $431 \times 10^3$  cel./ml) and azidiol ( $422 \times 10^3$  cel./ml) preservatives. However, high false SCC were obtained in non preserved milk ( $520 \times 10^3$  cel./ml), in which bacterial proliferation markedly changed it, particularly at analysis performed at  $60^\circ\text{C}$  ( $561 \times 10^3$  cel./ml). Higher SCC were also obtained at analytical temperature  $60^\circ\text{C}$  ( $474 \times 10^3$  cel./ml) than at  $40^\circ\text{C}$  ( $442 \times 10^3$  cel./ml). Storage temperature also influenced, changing values from  $469 \times 10^3$  cel./ml (refrigeration) to  $447 \times 10^3$  cel./ml (room temperature). Decreasing of SCC at different milk ages during the analysis period was 20%. Altogether, this results suggest the preservation and refrigeration of milk after recollection. Optimal analysis age, under these conditions, are 5 days or less. However, non refrigerated and non preserved milk should not be analyzed after 48 h.

In the second experiment, it was analyzed the effect of freezing, the preservative used, thawing method, sample age and temperature of analysis on the SCC by the FOE method. Thus, 68 aliquotes were obtained from each of 70 samples, and divided in four blocks of 17 aliquotes each, corresponding to the same preservation conditions described in the previous experiment. From the 17 aliquotes, one was stored in refrigeration, and the others at  $-20^\circ\text{C}$ . Duplicates from the refrigerated aliquotes were analyzed at 24 h (at  $40$  and  $60^\circ\text{C}$ ). Frozen aliquotes were divided in four lots of four aliquotes to be analyzed at 1, 15, 30 and 60 d. Two of these aliquotes were slowly thawed and duplicates analyzed at  $40$  and  $60^\circ\text{C}$ . The other two aliquotes were quickly thawed and processed in the same manner.

Very significant variations were obtained in the SCC depending on the storage temperature:  $333 \times 10^3$  cel./ml in refrigeration and  $235 \times 10^3$  cel./ml in freezing. This SCC decrease in freezing conditions was mainly obtained in samples preserved with azidiol ( $150 \times 10^3$  cel./ml) and at analytical temperature  $60^\circ\text{C}$  ( $183 \times 10^3$  cel./ml). No major differences were observed between thawed ( $327-352 \times 10^3$  cel./ml) and refrigerated milk (the reference point,  $275-339 \times 10^3$  cel./ml) in the other conditions studied. Residual variances of thawed samples were similar and comparable to



refrigerated milk, and their correlation coefficients were very high. Finally, study of these factors allowed us to define the optimal analytical and preservation conditions for SCC determination by the FOE method.



## VIII. BIBLIOGRAFÍA



- AMORENA, B., R. PENADÉS, I. ALBIZU y R. BASELGA (1992). Inmunomodulación. *Ovis*, (22): 87-106.
- ANDERSON, M., B.E. BROOKER, A.T. ANDREWS y E. ALICHANIDIS (1975). Membrane material in bovine skim-milk from udder quarters infused with endotoxin and pathogenic organisms. *J. Dairy Res.*, **42**: 401-417.
- ARDÖ, Y. (1979). Bronopol as a preservative in milk samples. *Milchwissenschaft*, **34** (1): 14-16.
- ARDÖ, Y. (1982). Bronopol as a preservative in milk samples for the determination of cell content using Fossomatic. *Milchwissenschaft*, **37**: 139-142.
- BARCINA, Y., M.A. ZORRAQUINO, J. PEDAUYE, G. ROS y F. RINCÓN, (1987). Azidiol as a preservative for milk samples. *An. Vet. (Murcia)*, **3**: 65-69.
- BARKEMA, H.W., J. VAN DER SCHANS, Y.H. SCHUKKEN, A.L.W. DE GEE, T.J.G.M. LAM y G. BENEDICTUS (1997). Effect of freezing on somatic cell count of quarter milk samples as determined by a Fossomatic electronic cell counter. *J. Dairy Sci.*, **80**: 422-426.
- BERTRAND, J.A. (1996). Influence of shipping container, preservative, and breed on analysis of milk components of shipped samples. *J. Dairy Sci.*, **79**: 145-148.
- BERTRAND, J.A., J.W. SMITH y J.K. BERTRAND (1990). Effect of shipping container and time on components of Jersey and Holstein milk. *J. Dairy Sci.*, **73** (Suppl. 1): 270 (Abstr.).
- BLACKBURN, P.S., C.M. LAING y D.F. MALCOLM (1955). A comparison of the diagnostic value of the total and differential cell counts of bovine milk. *J. Dairy Res.*, **22** (1): 37-42.
- BREMEL, R.D., L.H. SCHULTZ, F. R. GABLER y J. PETERS (1977). Estimating somatic cells in milk samples by the membrane-filter-DNA procedure. *J. Food Prot.*, **40** (1): 32-38.
- BROOKER, B.E. (1978). Characteristic cell fragments in bovine milk. *J. Dairy Res.*, **45**: 21-24.
- BROOKER (1980). Citado por DULIN *et al.* (1983b).
- BURCK, H.C. (1969). *Técnica histológica*. Editorial Paz Montalvo, Madrid.

- 
- CARROLL, E.J. y O.W. SCHALM (1962). Effect of deoxyribonuclease on the California test for mastitis. *J. Dairy Sci.*, **45** (9): 1.094-1.097.
- CASADO, P. y J.A. GARCÍA (1986). Métodos instrumentales para la detección de la mamitis. *In: Mamitis*. M.A. ZORRAQUINO (ed.), Luzán 5, S.A. de Ediciones, Madrid: 89-98.
- COLEMAN, D.A. y B.R. MOSS (1989). Effects of several factors on quantification of fat, protein, and somatic cells in milk. *J. Dairy Sci.*, **72**: 3.295-3.303.
- CONCHA, C., O. HOLMBERG y B. MOREIN (1978). Proportion of B- and T-lymphocytes in normal bovine milk. *J. Dairy Res.*, **45**: 287-290.
- CONTRERAS, A., D. SIERRA, J.C. CORRALES, A. SÁNCHEZ y C. GONZALO (1998). Diagnóstico indirecto de las mamitis caprinas. *Ovis*, (54): 25-36.
- DALE, M.M. y J.C. FOREMAN (1984). Introduction to the immunology and pathology of host defence mechanisms. *In: Textbook of Immunopharmacology*. M.M. DALE y J.C. FOREMAN (ed.), Blackwell, Oxford: 1-14.
- DOCE (1992). Directiva 92/46/CEE del Consejo, de 16 de junio de 1992, por la que se establecen las normas sanitarias aplicables a la producción y comercialización de leche cruda, leche tratada térmicamente y productos lácteos. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, N° L 268: 1-32.
- DOCE (1994). Directiva 94/71/CEE del Consejo, de 13 de diciembre de 1994, por la que se modifica la Directiva 92/46/CEE por la que se establecen las normas sanitarias aplicables a la producción y comercialización de leche cruda, leche tratada térmicamente y productos lácteos. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, N° L 368: 33-37.
- DROKE, E.A., M.J. PAAPE y A.L. DI CARLO (1993). Prevalence of high somatic cell counts in bulk tank goat milk. *J. Dairy Sci.*, **76**: 1.035-1.039.
- DULIN, A.M., M.J. PAAPE, S. BERKOW, M. HAMOSH y P. HAMOSH (1983a). Comparison of total somatic cells and differential cellular composition in milk from cows, sheep, goats, and humans. *Dairy Sci. Abstr.*, **45**: 908.
- DULIN, A.M., M.J. PAAPE, W.D. SCHULTZE y B.T. WEINLAND (1983b). Effect of parity, stage of lactation, and intramammary infection on concentration of somatic cells and cytoplasmic particles in goat milk. *J. Dairy Sci.*, **66**: 2.426-2.433.
- DULIN, A.M., M.J. PAAPE y B.T. WEINLAND (1982a). Cytospin centrifuge in differential counts of milk somatic cells. *J. Dairy Sci.*, **65**: 1.247-1.251.
- DULIN, A.M., M.J. PAAPE y W.P. WERGIN (1982b). Differentiation and enumeration of somatic cells in goat milk. *J. Food Prot.*, **45** (5): 435-439.
- DUNHAM, J.R., H. BECHTLE y M. OBERLANDER (1978). Chlorinated quaternized hexamine and potassium as preservative for milk samples. *J. Dairy Sci.*, **61**: 1.696-1.699.
- FIL-IDF (1991). Caractéristiques de fidélité des méthodes analytiques-schéma de conduite d'une étude collaborative. *Fédération Internationale de Laiterie*, Norme Internationale 135B, Bruxelles, Belgique.

- FIL-IDF (1995). Numération des cellules somatiques du lait. *Fédération Internationale de Laiterie*, Norme Internationale 148A, Bruxelles, Belgique.
- FUERTES, J.A., C. GONZALO, J.A. CARRIEDO y F. SAN PRIMITIVO (1998). Parameters of test day milk yield and milk components for dairy ewes. *J. Dairy Sci.*, **81**: 1.300-1.307.
- GOLDBLUM, R.M., S. AHLSTEDT, B. CARLSSON, L.A. HANSON, U. JODAL, G. LIDIN-JANSON y A. SOHL-AKERLUND (1975). Antibody-forming cells in human colostrum after oral immunisation. *Nature*, **257**: 797-799.
- GONZALO, C., J.A. BARO, J.A. CARRIEDO y F. SAN PRIMITIVO (1993). Use of the Fossomatic method to determine somatic cell counts in sheep milk. *J. Dairy Sci.*, **76**: 115-119.
- GONZALO, C., J.A. CARRIEDO, J.A. BARO y F. SAN PRIMITIVO (1994). Factors influencing variation of test day milk yield, somatic cell count, fat, and protein in dairy sheep. *J. Dairy Sci.*, **77**: 1.537-1.542.
- GONZALO, C. y V. GAUDIOSO (1983). Recuento celular en leche de oveja. Comparación entre ordeño mecánico y manual. *III Symposium Internacional de Ordeño Mecánico de Pequeños Rumiantes*, Valladolid.
- GONZALO, C. y V.R. GAUDIOSO (1985). Evolution des types cellulaires du lait de brebis (race Churra) en fonction des dénombrements cellulaires totaux pendant la traite mécanique et manuelle. *Ann. Zootech.*, **34** (3): 257-264.
- GONZALO, C., J.R. MARTÍNEZ y F. SAN PRIMITIVO (1998). Significación y métodos de valoración del recuento celular en la leche de oveja. *Ovis*, (56):13-25.
- GONZALO, C., E. VIJIL, M. RODRÍGUEZ y F.C. FUENTES (1988). Contenido y tipos celulares del calostro ovino y su evolución en el tránsito de calostro a leche. *ITEA*, (76): 15-25.
- GRAPPIN, R. y R. JEUNET (1974). Premiers essais de l'appareil "Fossomatic" pour la détermination automatique du nombre de cellules du lait. *Le Lait*, **54**: 627-644.
- GREEN, T.J. (1984). Use of somatic cell counts for detection of subclinical mastitis in ewes. *Vet. Rec.*, **114**: 43.
- HAMANN, J., P. GYODI y W. HEESCHEN (1991). On the influence of varying preserving agents and storage times on somatic cell counting in milk using the Fossomatic-360 and Fossomatic-180. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, **43** (3): 273-295.
- HEALD, C.W. (1985). Milk collection. In: *Lactation*. B.L. LARSON (ed.), The Iowa State University Press, Ames, Io.: 198-228.
- HEALD, C.W., G.M. JONES, S.C. NICKERSON, W.N. PATTERSON y W.E. VINSON (1977). Preliminary evaluation of the Fossomatic somatic cell counter for analysis of individual cow samples in a central testing laboratory. *J. Food Prot.*, **40** (8): 523-526.
- HEESCHEN, W. (1975). Determination of somatic cells in milk (technical aspects of counting). *Bull. Int. Dairy Fed.*, **85**: 79-92.
- HEESCHEN, W.H. (1994). Counting somatic cells in milk: results of IDF intercomparison trials. *Newsletters of the International Dairy Federation*, (140): 3-4.

- 
- HILL, A.W., K.G. HIBBIT y J. DAVIES (1982). Particles in bulk milk capable of causing falsely high electronic cell counts. *J. Dairy Res.*, **49**: 171-177.
- HOARE, R.J.T., P.J. NICHOLLS y R. F. SHELDRAKE (1982). Investigations into falsely elevated somatic cell counts of bulked herd milk. *J. Dairy Res.*, **49**: 559-565.
- HOARE, R.J.T., R.F. SHELDRAKE, P.J. NICHOLLS, G.D. MCGREGOR y V.E. WOODHOUSE (1980). Analysis of somatic cell volume distribution as an aid to the diagnosis of mastitis. *J. Dairy Res.*, **47**: 167-176.
- HUTJENS, M.F., L.H. SCHULTZ, G.E. WARD y S. YAMDAGNI (1970). Estimation of somatic cells in milk using membrane filter separation and DNA determination with diphenylamine. *J. Milk Food Technol.*, **33**: 227-231.
- JASPER D.E. (1980). Mastitis. In: *Bovine Medicine and Surgery*. H.E. AMSTUTZ (ed.), Vol. II, 2nd edition, American Veterinary Publ. Inc., USA: 1.047-1.092.
- JENSEN, D.L. y R.J. EBERHART (1981). Total and differential cell counts in secretions of the nonlactating bovine mammary gland. *Am. J. Vet. Res.*, **42**: 743-747.
- KEISLER, D.H., M.L. ANDREWS y R.J. MOFFATT (1992). Subclinical mastitis in ewes and its effect on lamb performance. *J. Anim. Sci.*, **70**: 1.677-1.681.
- KENNEDY, B.W., M.S. SETHAR, A.K.W. TONG, J.E. MOXLEY y B.R. DOWNEY (1982). Environmental factors influencing test-day somatic cell counts in Holsteins. *J. Dairy Sci.*, **65**: 275-280.
- KROGER, M. (1985). Milk sample preservation. *J. Dairy Sci.*, **68**: 783-787.
- KROGER, D. y D.E. JASPER (1967). Relationships between Wisconsin mastitis test scores and cell counts in milk. *J. Dairy Sci.*, **50** (8): 1.226-1.233.
- LE GALL, A. y M. PLOMMET (1965). Observations sur la croissance des staphylocoques et la réaction leucocytaire au cours des premières heures de la mammite expérimentale de la brebis. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.*, **5**: 113-130.
- LEE, K.L., K.P. DAYTON, G. KROLL y M.L. MCGILLIARD (1986). Effects of preservative, storage time, and storage temperature on milkfat percent, protein percent and somatic cell count determination. *J. Dairy Sci.*, **69** (Suppl. 1): 211 (Abstr.).
- LEE y LASCELLES (1970). Citados por LEE y OUTERIDGE (1981).
- LEE, CH.-S. y P.M. OUTERIDGE (1981). Leucocytes of sheep colostrum, milk and involution secretion, with particular reference to ultrastructure and lymphocyte sub-populations. *J. Dairy Res.*, **48**: 225-237.
- LEE, CH.-S., F.B.P. WOODING y P. KEMP (1980). Identification, properties, and differential counts of cell populations using electron microscopy of dry cows secretions, colostrum and milk from normal cows. *J. Dairy Res.*, **47**: 39-50.
- MARCO, J.C. (1994). *Mastitis en la oveja Latxa: epidemiología, diagnóstico y control*. Tesis Doctoral, Universidad de Zaragoza, España.
- MARCO, J.C., L. ROMEO y M. ROMEO (1992). Etiología. *Ovis*, (21): 25-43.



- MARTÍNEZ, J.R., C. GONZALO y F. SAN PRIMITIVO (1997). Valoración de métodos de recuento celular en leche de oveja. *ITEA*, **volumen extra** (18): 570-572.
- MERCK Y CO., INC. (1976). *The Merck Index*. 9th ed., Rahway, NJ.
- MILLER, R.H., M.J. PAAPE y J.C. ACTON (1986). Comparison of milk somatic cell counts by Coulter and Fossomatic counters. *J. Dairy Sci.*, **69**: 1.942-1.946.
- NATIONAL INSTITUTE FOR OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH (1975). *Criteria for recommended standard...Exposure to chromium VI*. DHHS Publ. No. [NIOSH], Cincinnati, OH: 76-129.
- NELSON, F.E., J.D. SCHUH y G.H. STOTT (1967). Influence of season on leukocytes in milk. *J. Dairy Sci.*, **50**: 978 (Abstr.).
- NG-KWAI-HANG, K.F. y J.F. HAYES (1982). Effect of potassium dichromate and sample storage time on fat and protein by Milko-Scan and on protein and casein by modified Pro-Milk Mk method. *J. Dairy Sci.*, **65**: 1.895-1.899.
- NICKERSON, S.C. y C.W. HEALD (1982). Cells in local reaction to experimental *Staphylococcus aureus* infection in bovine mammary gland. *J. Dairy Sci.*, **65**: 105-116.
- OUTTERIDGE, P.M. y C.S. LEE (1981). Cellular immunity in the mammary gland with particular reference to T-, B-lymphocytes and macrophages. In: *The Ruminant Immune System*. J.E. BUTLER (ed.), Plenum Publishing Corporation, U.S.A.: 513-534.
- PAAPE, M.J., A.J. GUIDRY, S.T. KIRK y D.J. BOLT (1975). Measurement of phagocytosis of 32-P-labelled *Staphylococcus aureus* by bovine leukocytes: lysostaphin digestion and inhibitory effect of cream. *Am. J. Vet. Res.*, **36**: 1.737-1.743.
- PAAPE, M.J., H.D. HAFS y W.W. SNYDER (1963). Variation of estimated numbers of milk somatic cells stained with Wright's stain or pyronin Y-methyl green stain. *J. Dairy Sci.*, **46**: 1.211-1.216.
- PAAPE, M.J. y H.A. TUCKER (1966). Somatic cell content variation in fraction-collected milk. *J. Dairy Sci.*, **49** (3): 265-267.
- PARK, Y.H., L.K. FOX, M.J. HAMILTON y W.C. DAVIS (1992). Bovine mononuclear leukocyte subpopulations in peripheral blood and mammary gland secretions during lactation. *J. Dairy Sci.*, **75** (4): 998-1.006.
- PARMELY, M.J. y A.E. BEER (1977). Colostral cell-mediated immunity and the concept of a common secretory immune system. *J. Dairy Sci.*, **60** (4): 655-665.
- PEARSON, J.K.L., C.L. WRIGHT y D.O. GREER (1970). A study of methods for estimating the cell content of bulk milk. *J. Dairy Res.*, **37**: 467-480.
- PERIS, C., J.R. DÍAZ y N. FERNÁNDEZ (1993). Detection of mastitis in ewes: relation between CMT and somatic cell count (Foss.). *Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Symposium on Machine Milking of Small Ruminants*, Budapest, Hungary.
- PETTERSEN, K.-E. (1981). Cell content in goat milk. *Acta Vet. Scand.*, **22**: 226-237.
- PHIPPS, L.W. (1968). Electronic counting of cells in milk: examination of a chemical treatment for dispersal of milk fat. *J. Dairy Res.*, **35**: 295-302.

- 
- PHIPPS, L.W. y F.H.S. NEWBOULD (1966). Determination of leucocyte concentrations in cow's milk with a Coulter counter. *J. Dairy Res.*, **33**: 51-64.
- POUTREL, B. y C. LERONDELLE (1983). Cell content of goat milk: California mastitis test, Coulter counter, and Fossomatic for predicting half infection. *J. Dairy Sci.*, **66**: 2.575-2.579.
- POUTREL, B. y P. RAINARD (1982). Predicting the probability of quarter infection (by major pathogens) from somatic cell concentration. *Am. J. Vet. Res.*, **43**: 1.296-1.299.
- READ, R.B., JR., A.L. REYES y J.G. BRADSHAW (1969). Effect of freezing milk samples on abnormal milk test results. *J. Dairy Sci.*, **52** (2): 261-262.
- RENEAU, K. (1986). Effective use of dairy herd improvement somatic cell counts in mastitis control. *J. Dairy Sci.*, **69**: 1.708-1.720.
- ROGUINSKY, M. (1974). Numération cellulaire électronique des laits de petits ruminants. *Ann. Zootech.*, (hors-série): 117-118.
- ROTA, A.M., C. GONZALO, P. RODRÍGUEZ, A. ROJAS, L. MARTÍN y J. TOVAR (1993). Somatic cell types in goat milk in relation to total cell count, stage and number of lactation. *Small Rumin. Res.*, **12**: 89-98.
- RUSSELL, M.W., B.E. BROOKER y B. REITER (1976). Inhibition of the bactericidal activity of bovine polymorphonuclear leucocytes and related systems by casein. *Res. Vet. Sci.*, **20**: 30-35.
- SANDHU, J.S., N. NASIR, H. NARAYANASWAMY y O.P. KAPOR (1984). Study on the effect of formalin as a preservative on different constituents of raw milk samples during storage. *J. Food Sci. Technol. India*, **211**: 424-425.
- SAS (1992). Institute Inc., SAS/STAT User's Guide, Version 6, 10<sup>th</sup> ed.; Cary, NC: SAS Institute Inc.
- SCHALM, O.W., E.J. CARROLL y N.C. JAIN (1971). *Bovine mastitis*. Lea & Febiger, Philadelphia, USA.
- SCHALM y GRAY (1954). Citados por SCHALM *et al.* (1971).
- SCHMIDT-MADSEN, P. (1975). Fluoro-opto-electronic cell-counting on milk. *J. Dairy Res.*, **42**: 227-239.
- SCHMIDT-MADSEN, P. (1979). Influence of storage and preservation of milk samples on microscopic and Fossomatic somatic cell counts. *Nord. Vet.-Med.*, **31**: 449-454.
- SCHNEIDER, R. y D.E. JASPER (1966a). Some factors responsible for variation in counting somatic cells on Prescott-Breed smears of milk. *J. Milk Food Technol.*, **29**: 5-9.
- SCHNEIDER, R. y D.E. JASPER (1966b). The influence of the working factor and cell content on the precision of microscopic counts of milk somatic cells. *J. Milk Food Technol.*, **29**: 49-52.
- SELSTED, M.E., Y.-Q. TANG, W.L. MORRIS, P.A. MCGUIRE, M.J. NOVOTNY, W. SMITH, A.H. HENSCHEN y J.S. CULLOR (1993). Purification, primary structures, and

- antibacterial activities of  $\beta$ -defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. *J. Biol. Chem.*, **268** (9): 6.641-6.648.
- SHAFFER-WEAVER, K.A. y L.M. SORDILLO (1996). Enhancing bactericidal activity of bovine lymphoid cells during the periparturient period. *J. Dairy Sci.*, **79** (8): 1.347-1.352.
- SHELDRAKE, R.F., R.J.T. HOARE y V.E. WOODHOUSE (1981). Relationship of somatic cell count and cell volume analysis of goat's milk to intramammary infection with coagulase-negative staphylococci. *J. Dairy Res.*, **48**: 393-403.
- SIERRA, D., M. BARBERÁN, A. SÁNCHEZ, J.C. CORRALES, J.C. MARCO y A. CONTRERAS (1996a). Differentiation of cell types and cytoplasmic particles in the milk of healthy goats using a modified Gallego's stain technique. *In: Production and utilization of ewe and goat milk*. International Dairy Federation, Brussels, Belgium: 342.
- SIERRA, D., M.J. GARCÍA, M. BARBERÁN, J.C. CORRALES, A. SÁNCHEZ, J.C. MARCO y A. CONTRERAS (1996b). Differentiation of cell populations and cytoplasmic particles in bulk tank goat milk using a modified Gallego's stain technique. *In: Production and utilization of ewe and goat milk*. International Dairy Federation, Brussels, Belgium: 341.
- SINGH, B. y R.T. MARSHALL (1966). Effects of leucocyte degeneration on mastitis screening tests. *J. Milk Food Technol.*, **29**: 333-335.
- SMITH, C. y M. ROGUINSKY (1977). Mastitis and other diseases of the goat's udder. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, **171**: 1.241-1.248.
- SORDILLO, L.M. y S.C. NICKERSON (1988). Morphologic changes in the bovine mammary gland during involution and lactogenesis. *Am. J. Vet. Res.*, **49** (7): 1.112-1.120.
- SORDILLO, L.M., S.C. NICKERSON y R.M. AKERS (1989). Pathology of *Staphylococcus aureus* mastitis during lactogenesis: relationships with bovine mammary structure and function. *J. Dairy Sci.*, **72** (1): 228-240.
- SORDILLO, L.M., K. SHAFFER-WEAVER y D. DEROSA (1997). Immunobiology of the mammary gland. *J. Dairy Sci.*, **80**: 1.851-1.865.
- STEVENS, A. y J.D. BANCROFT (1990). Proteins and nucleic acids. *In: Theory and practice of histological techniques*. J.D. BANCROFT y A. STEVENS (ed.), 3<sup>rd</sup> ed., Longman Group UK Limited, UK: 143-153.
- STRUGGER, S. (1945, 46). The present position of acridine orange as a stain for living and dead cells in the examination of milk. *Dairy Sci. Abs.*, **7**: 265.
- SZIJARTO, L.F. y D.A. BARNUM (1984). Preparation, use and evaluation of standards developed for simultaneous monitoring of Coulter and Fossomatic electronic cell counting instruments in Ontario. *J. Food Prot.*, **47** (3): 227-231.
- TARDÁGUILA, J.A. (1999). *Estrategias de control de mastitis basadas en la terapia antibiótica de secado en el ganado ovino de raza Churra*. Tesis Doctoral, Universidad de León, España.
- THIEULIN, G. y R. VUILLAUME (1967). Eléments pratiques d'analyse et d'inspection du lait, de produits laitiers et des oeufs. (3<sup>ème</sup> édition). *Le Lait*, (hors série): 160-173.

- 
- THOMPSON, D.I. y D.S. POSTLE (1964). The Wisconsin mastitis test-an indirect estimation of leucocytes in milk. *J. Milk Food Technol.*, **27**: 271-275.
- VERMUNT, A.E.M., G.J.M. LOEFFEN, H. VAN DER VOET y M.A.A.M. NABER (1995). Development of reference samples for the calibration and quality control of somatic cell count using a Fossomatic instrument. *Netherlands Milk y Dairy Journal*, **49**: 111-123.
- WARD, G.E. y L.H. SCHULTZ (1973). Estimation of somatic cells in milk by filter-deoxyribonucleic acid method with indole. *J. Dairy Sci.*, **56**: 1.097-1.101.
- WILKINSON, P.C. (1984). Cellular accumulation and inflammation. In: *Textbook of Immunopharmacology*. M.M. DALE y J.C. FOREMAN (ed.), Blackwell, Oxford: 217-232.
- WILLIAMS, M.R., N. CRAVEN, T.R. FIELD y K.J. BUNCH (1985). The relationship between phagocytosis and intracellular killing of *Staphylococcus aureus* by bovine neutrophils. *Br. Vet. J.*, **141**: 362-371.
- WOODING *et al.* (1977). Citados por LEE y OUTERIDGE (1981).
- WOODING, F.B.P., M. PEAKER y J.L. LINZELL (1970). Theories of milk secretion: evidence from the electron microscopic examination of milk. *Nature*, **226**: 762-764.
- WRIGHT, C.L. y J.K.L. PEARSON (1969). A comparison of methods for estimating the cell content of bulk milk. *Vet. Rec.*, **84** (11): 288-290.
- ZAKIR, M.D., G. NARASIMHA, V. RAGHVA y P. MALLAYASASTRI (1984). Effect of certain preservatives on composite milk samples stored at room temperature. *Indian J. Dairy Sci.*, **37**: 30-32.

## IX. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS



## IX.1. ÍNDICE DE TABLAS

---

<b>Tabla II.1.</b>	Principales series de equipos que utilizan el método FOE para el RCS ...	33
<b>Tabla II.2.</b>	RCS ( $\times 10^3/\text{ml}$ ) de la leche cisternal y alveolar en función del método de almacenamiento .....	38
<b>Tabla II.3.</b>	RCS ( $\times 10^3/\text{ml}$ ) medios en función de la edad de la muestra y del método de almacenamiento de la muestra de leche.....	38
<b>Tabla II.4.</b>	Variaciones del RCS con la edad de la muestra a 4° C por el método REP .....	42
<b>Tabla II.5.</b>	Interpretación del CMT en leche de oveja .....	48
<b>Tabla II.6.</b>	Interpretación del test de Brabante .....	50
<b>Tabla II.7.</b>	Porcentaje de gas y RCS en el test de la catalasa.....	52
<b>Tabla II.8.</b>	Comparación entre los métodos FOE, MD (factor de trabajo $10^4$ ) y REP en un total de 674 muestras de leche individual de vaca .....	54
<b>Tabla II.9.</b>	Coefficientes de correlación entre los métodos MD, REP, RPAFC y FOE en la leche de vaca (n = 88) .....	56
<b>Tabla II.10.</b>	RCS ( $\times 10^3/\text{ml}$ ) obtenidos por diferentes métodos en 4 muestras de leche recogidas en una granja de ganado vacuno lechero .....	56
<b>Tabla II.11.</b>	Comparación de métodos de estimación de células somáticas en leche de cabra.....	58
<b>Tabla III.1.</b>	Diseño experimental (Experiencia I).....	69
<b>Tabla III.2.</b>	Diseño experimental (Experiencia II) .....	84
<b>Tabla IV.1.</b>	Medias aritméticas y logarítmicas obtenidas por MD (3 tinciones).....	89
<b>Tabla IV.2.</b>	Coefficientes de correlación dentro del método MD a las 24 horas posrecogida.....	90
<b>Tabla IV.3.</b>	Valores F del <i>factor oveja</i> , varianzas residuales, repetibilidades y errores estándar del método MD (3 tinciones) .....	91
<b>Tabla IV.4.</b>	Recuento de PC mediante el método MD por tres tinciones.....	92

## IX.1. Índice de tablas

---

<b>Tabla IV.5.</b>	Medias aritméticas, logarítmicas y geométricas obtenidas por MD (3 tinciones) y por el método FOE a las 24 horas posrecogida .....	94
<b>Tabla IV.6.</b>	Coefficientes de correlación entre el método MD y el FOE .....	97
<b>Tabla IV.7.</b>	Valores F del <i>factor oveja</i> , varianzas residuales, repetibilidades y errores estándar de los distintos métodos de recuento .....	101
<b>Tabla IV.8.</b>	Medias, desviaciones estándar y coeficientes de variación del RCS para el total de observaciones (n = 23.003) del presente estudio .....	102
<b>Tabla IV.9.</b>	Análisis de varianza (ANOVA) de los factores de variación del logaritmo del RCS de la leche analizada con el método FOE .....	103
<b>Tabla IV.10.</b>	Efecto de la conservación sobre el RCS de la leche de oveja analizada con el método FOE .....	104
<b>Tabla IV.11.</b>	Efecto de la temperatura de análisis sobre el RCS de la leche de oveja analizada por el método FOE .....	105
<b>Tabla IV.12.</b>	Efecto del modo de almacenamiento de la leche (refrigeración o temperatura ambiente) sobre el RCS de la leche de oveja analizada por el método FOE .....	108
<b>Tabla IV.13.</b>	Efecto de la interacción conservación x temperatura de análisis sobre el RCS de la leche de oveja analizada por el método FOE .....	113
<b>Tabla IV.14.</b>	Efecto de la interacción almacenamiento x conservación sobre el RCS de la leche analizada por el método FOE .....	113
<b>Tabla IV.15.</b>	Efecto de la interacción almacenamiento x conservación x temperatura de análisis sobre el RCS analizado por el método FOE .....	115
<b>Tabla IV.16.</b>	ANOVA de los efectos de la refrigeración y de la congelación, considerando el tipo de conservación utilizada y la temperatura de de análisis, sobre el RCS de leche de oveja (método FOE) .....	121
<b>Tabla IV.17.</b>	Efecto del almacenamiento sobre el RCS de la leche de oveja (método FOE) .....	122
<b>Tabla IV.18.</b>	Efecto de la interacción almacenamiento x temperatura de análisis sobre el RCS de la leche de oveja analizada con el método FOE .....	122
<b>Tabla IV.19.</b>	Efecto de la interacción almacenamiento x conservación sobre el RCS de la leche de oveja analizada con el método FOE .....	123
<b>Tabla IV.20.</b>	Efecto de la interacción almacenamiento x conservación x temperatura de análisis sobre el RCS de la leche de oveja analizada con el método FOE .....	124
<b>Tabla IV.21.</b>	ANOVA del efecto de la conservación, edad de la leche, tipo de descongelación y temperatura de análisis sobre el RCS (método FOE) en muestras de leche de oveja mantenidas a temperatura de congelación	127
<b>Tabla IV.22.</b>	Efecto de la conservación sobre el RCS de la leche descongelada de oveja analizada con el método FOE .....	128



---

<b>Tabla IV.23.</b>	Efecto del tipo de descongelación sobre el recuento celular de la leche descongelada de oveja analizada con el método FOE.....	128
<b>Tabla IV.24.</b>	Efecto de la edad de la leche sobre el RCS de la leche descongelada de oveja analizada con el método FOE .....	129
<b>Tabla IV.25.</b>	Efecto de la interacción temperatura de análisis x tipo de descongelación sobre el RCS de la leche descongelada de oveja analizada con el método FOE.....	130
<b>Tabla IV.26.</b>	Efecto de la interacción temperatura de análisis x conservación sobre el RCS de la leche descongelada de oveja analizada con el método FOE ....	132
<b>Tabla IV.27.</b>	Efecto de la interacción conservación x tipo de descongelación sobre el RCS de la leche descongelada de oveja analizada con el método FOE ....	132
<b>Tabla IV.28.</b>	Efecto de la interacción temperatura de análisis x conservación x tipo de descongelación sobre el RCS de la leche descongelada de oveja analizada con el método FOE.....	133
<b>Tabla IV.29.</b>	Coefficientes de correlación entre los RCS en condiciones ideales y los de leche descongelada en las condiciones de estudio.....	135
<b>Tabla IV.30.</b>	Valores F del <i>factor oveja</i> , varianzas residuales, repetibilidades y errores estándar de los RCS, obtenidos mediante el método FOE, de leche de oveja en condiciones ideales y en la leche descongelada en las condiciones óptimas .....	138

## IX.2. ÍNDICE DE FIGURAS

---

<b>Figura II.1.</b>	Líneas de regresión y coeficientes de correlación (r) de las concentraciones de los principales tipos celulares de la leche en función del RCS total en la leche de oveja Churra en mitad de lactación .....	19
<b>Figura II.2.</b>	Mecanismo de migración leucocitaria desde la sangre a la luz alveolar ..	21
<b>Figura II.3.</b>	Grados de reacción al test de Whiteside .....	47
<b>Figura II.4.</b>	Embudo usado en el test de Brabante .....	49
<b>Figura II.5.</b>	Test de la catalasa, llevado a cabo en tubos de fermentación de Smith, con un porcentaje de gas que va desde el 0 hasta el 40% .....	52
<b>Figura II.6.</b>	Histograma mostrando una distribución del volumen celular .....	61
<b>Figura III.1.</b>	Tinción azul de metileno: células somáticas.....	73
<b>Figura III.2.</b>	Tinción azul de metileno: partícula citoplasmática .....	73
<b>Figura III.3.</b>	Tinción May-Grünwald-Giemsa: células somáticas .....	74
<b>Figura III.4.</b>	Tinción May-Grünwald-Giemsa: células somáticas y partícula citoplasmática .....	74
<b>Figura III.5.</b>	Tinción pironina Y-verde de metilo: células somáticas.....	75
<b>Figura III.6.</b>	Tinción pironina Y-verde de metilo: célula somática y partículas citoplasmáticas .....	75
<b>Figura III.7.</b>	Analizador Fossomatic 90® .....	77
<b>Figura IV.1.</b>	Cúmulo bacteriano (tinción pironina Y-verde de metilo).....	95
<b>Figura IV.2.</b>	Cúmulo bacteriano y célula somática (tinción pironina Y-verde de metilo).....	95
<b>Figura IV.3.</b>	Recta de regresión del log RCS de la leche de oveja a las 24 horas posrecogida entre el método FOE (FOE-BR-TR-60) y el MD (tinción MGG).....	98
<b>Figura IV.4.</b>	Recta de regresión del log RCS de la leche de oveja a las 24 horas posrecogida entre el método FOE (FOE-SC-TA-60) y el MD (tinción AM).....	100

<b>Figura IV.5.</b> Evolución del RCS de la leche de oveja en función de la edad de la muestra analizada por el método FOE.....	107
<b>Figura IV.6.</b> Evolución del RCS con la edad de la muestra de leche bajo dos condiciones diferentes de almacenamiento de la leche, según el método FOE.....	109
<b>Figura IV.7.</b> Evolución del recuento celular con la edad de la muestra de leche en función de la conservación de la misma, según el método FOE .....	111
<b>Figura IV.8.</b> Efecto de la interacción edad x temperatura de análisis sobre el RCS de la leche de oveja por el método FOE.....	114
<b>Figura IV.9.</b> Efecto de la interacción edad x conservación x almacenamiento sobre el RCS analizado por el método FOE.....	117
<b>Figura IV.10.</b> Efecto de la interacción edad x conservación x temperatura de análisis sobre el RCS analizado por el método FOE.....	118
<b>Figura IV.11.</b> Evolución del RCS de leche de oveja descongelada en función de la temperatura de análisis y analizada por el método FOE .....	131
<b>Figura IV.12.</b> Recta de regresión entre los RCS en condiciones ideales y los de leche descongelada conservada con dicromato potásico (DP) .....	136
<b>Figura IV.13.</b> Recta de regresión entre los RCS en condiciones ideales y los de leche descongelada conservada con azidiol (AZ).....	137



## X. ÍNDICE DE ABREVIATURAS



<b>40:</b>	Análisis a 40° C
<b>60:</b>	Análisis a 60° C
<b>AA:</b>	Auto Analyzer <sup>®</sup>
<b>AM:</b>	Azul de metileno
<b>ANOVA:</b>	Análisis de varianza
<b>AZ:</b>	Azidiol
<b>BR:</b>	Bronopol
<b>CC:</b>	Contador Coulter <sup>®</sup>
<b>cel.:</b>	Cell
<b>cél.:</b>	Célula
<b>CMT:</b>	Test de California
<b>CV:</b>	Coefficiente de variación
<b>d:</b>	Día/day
<b>DE:</b>	Desviación estándar
<b>DM:</b>	Direct microscopic (method)
<b>DP:</b>	Dicromato potásico
<b>EDTA:</b>	Ácido etilendiamino tetraacético
<b>ES:</b>	Error estándar
<b>FOE:</b>	Fluoro-opto-electrónico (método)/fluoro-opto-electronic (method)
<b>gl:</b>	Grados de libertad
<b>h:</b>	Hora/hour
<b>L:</b>	Linfocito
<b>M:</b>	Macrófago
<b>MB:</b>	Methylene blue
<b>MD:</b>	Microscopía directa o microscópico directo (método)

---

<b>MGG:</b>	May-Grünwald-Giemsa
<b>MMC:</b>	Media de mínimos cuadrados
<b>ND:</b>	No disponible (dato)
<b>PBS:</b>	Tampón fosfato salino
<b>PC:</b>	Partícula citoplasmática
<b>PMG:</b>	Pyronin Y-methyl green
<b>PMN:</b>	Leucocito polimorfonuclear
<b>PVM:</b>	Pironina Y-verde de metilo
<b>r:</b>	Coefficiente de correlación
<b>r<sup>2</sup>:</b>	Coefficiente de determinación
<b>RCS:</b>	Recuento de células somáticas
<b>REP:</b>	Recuento electrónico de partículas
<b>RPAFC:</b>	Recuento de partículas por análisis de flujo continuo
<b>SC:</b>	Sin conservante
<b>SCC:</b>	Somatic cell count
<b>T<sup>a</sup>:</b>	Temperatura
<b>TA:</b>	Temperatura ambiente (20° C)
<b>TC:</b>	Temperatura de congelación (-20° C)
<b>TR:</b>	Temperatura de refrigeración (4° C)
<b>TSB:</b>	Tripticasa-caldo de soja



## **XI. ANEXO:**

Recuentos de células somáticas, en términos de logaritmo decimal, obtenidos por microscopía directa (3 tinciones) y por el método fluoro-opto-electrónico a las 24 horas posrecogida, correspondientes a las 80 muestras, por duplicado, de la Experiencia I



Nº Muestra	AM	MGG	PVM	FOE SC	FOE DP	FOE AZ	FOE BR	FOE SC	FOE DP	FOE AZ	FOE BR	FOE SC	FOE DP	FOE AZ	FOE BR	FOE SC	FOE DP	FOE AZ	FOE BR
				TA-40	TA-40	TA-40	TA-40	TA-60	TA-60	TA-60	TA-60	TR-40	TR-40	TR-40	TR-40	TR-60	TR-60	TR-60	TR-60
1	3,602	4,785	4,740	5,170	4,929	4,756	4,799	6,242	5,107	4,785	4,716	5,000	4,833	4,857	4,833	4,886	4,839	4,756	4,799
1	4,000	4,973	4,699	5,270	5,004	4,799	4,892	6,178	5,143	4,785	4,903	4,929	4,869	4,839	4,857	4,898	4,857	4,845	4,851
2	4,477	4,623	4,176	5,642	4,643	4,505	4,663	5,754	4,771	4,602	4,591	4,690	4,602	4,613	4,580	4,681	4,708	4,602	4,531
2	4,398	4,653	4,447	5,667	4,792	4,591	4,633	5,825	4,845	4,602	4,568	4,857	4,643	4,623	4,653	4,663	4,690	4,568	4,613
3	4,380	4,380	4,380	5,461	4,833	4,531	4,748	5,873	5,104	4,716	4,556	4,672	4,643	4,568	4,672	4,663	4,748	4,763	4,663
3	4,623	4,633	4,146	5,501	4,881	4,672	4,792	5,920	5,097	4,792	4,643	4,643	4,699	4,477	4,699	4,820	4,785	4,792	4,732
4	4,462	4,491	4,380	5,569	4,756	4,380	4,556	5,842	4,892	4,447	4,505	4,845	4,447	4,431	4,505	4,716	4,505	4,447	4,580
4	4,591	4,362	4,462	5,601	4,699	4,431	4,568	5,840	4,875	4,477	4,462	4,839	4,602	4,519	4,462	4,771	4,491	4,544	4,491
5	4,613	4,415	4,431	4,633	4,531	4,491	4,544	4,491	4,519	4,342	4,462	4,544	4,531	4,544	4,643	4,505	4,491	4,431	4,505
5	4,591	4,580	4,491	4,708	4,602	4,447	4,613	4,568	4,431	4,477	4,380	4,556	4,556	4,531	4,633	4,362	4,447	4,398	4,415
6	4,672	4,613	4,602	5,196	4,806	4,763	4,778	5,666	4,886	4,699	4,716	4,845	4,785	4,778	4,699	4,857	4,681	4,690	4,785
6	4,623	4,892	4,633	5,305	4,833	4,839	4,785	5,713	4,940	4,732	4,740	4,813	4,799	4,785	4,863	4,924	4,806	4,813	4,763

40: análisis a 40° C; 60: análisis a 60° C; AM: azul de metileno; AZ: azidiol; BR: bronopol; DP: dicromato potásico; FOE: método fluoro-opto-electrónico; MGG: May-Grünwald-Giemsa; PVM: pironina Y-verde de metilo; SC: sin conservante; TA: temperatura ambiente; TR: temperatura de refrigeración.

N° Muestra	AM	MGG	PVM	FOE SC	FOE DP	FOE AZ	FOE BR	FOE SC	FOE DP	FOE AZ	FOE BR	FOE SC	FOE DP	FOE AZ	FOE BR	FOE SC	FOE DP	FOE AZ	FOE BR
				TA-40	TA-40	TA-40	TA-40	TA-60	TA-60	TA-60	TA-60	TR-40	TR-40	TR-40	TR-40	TR-60	TR-60	TR-60	TR-60
7	4,568	4,568	4,672	5,505	4,716	4,643	4,681	5,806	5,049	4,580	4,643	4,653	4,568	4,556	4,699	4,653	4,643	4,699	4,690
7	4,740	4,740	4,544	5,549	4,820	4,580	4,663	5,897	5,076	4,623	4,591	4,708	4,716	4,690	4,748	4,681	4,716	4,732	4,672
8	4,778	4,903	4,556	5,241	5,009	4,944	5,037	5,911	4,914	4,881	4,851	5,000	4,857	4,845	4,929	4,973	4,826	4,839	4,949
8	4,672	5,000	4,716	5,365	4,973	4,919	5,090	5,943	4,914	4,987	4,903	5,017	4,968	4,886	5,037	4,944	4,949	4,919	4,881
9	4,602	5,000	4,954	5,228	4,991	4,886	4,944	6,280	5,029	5,004	4,748	5,004	4,949	4,996	4,973	4,892	4,898	4,959	4,892
9	4,881	5,045	5,025	5,253	5,009	4,978	5,057	6,313	5,117	4,949	4,799	4,964	4,964	4,987	4,903	4,959	4,964	4,924	4,940
10	4,839	4,929	5,111	5,253	5,190	4,987	5,188	5,164	5,086	5,009	5,104	5,086	5,114	5,009	5,204	5,090	5,057	5,100	5,083
10	4,778	4,964	5,149	5,236	5,253	5,021	5,276	5,152	5,111	5,083	5,037	5,167	5,114	5,090	5,210	5,137	5,107	5,079	5,130
11	4,886	4,763	4,531	5,064	4,813	4,699	4,863	5,690	4,851	4,756	4,799	4,934	4,771	4,778	4,839	4,756	4,851	4,732	4,914
11	4,826	4,959	4,653	5,301	4,914	4,857	4,845	5,759	4,903	4,845	4,914	4,839	4,903	4,820	4,863	4,839	4,914	4,845	4,833
12	4,813	4,940	4,663	5,380	4,944	4,924	4,919	6,065	5,068	4,845	4,875	4,908	4,851	4,806	4,869	4,924	4,833	4,903	4,949
12	4,919	4,820	4,431	5,377	5,053	4,924	4,987	6,099	5,068	4,863	4,845	4,973	4,886	4,929	4,886	4,886	4,914	4,954	4,886

40: análisis a 40° C; 60: análisis a 60° C; AM: azul de metileno; AZ: azidiol; BR: bronopol; DP: dicromato potásico; FOE: método fluoro-opto-electrónico; MGG: May-Grünwald-Giemsa; PVM: pironina Y-verde de metilo; SC: sin conservante; TA: temperatura ambiente; TR: temperatura de refrigeración.

N° Muestra	AM	MGG	PVM	FOE	FOE	FOE	FOE	FOE	FOE	FOE	FOE	FOE	FOE	FOE	FOE	FOE	FOE	FOE	FOE
				SC	DP	AZ	BR	SC	DP	AZ	BR	SC	DP	AZ	BR	SC	DP	AZ	BR
				TA-40	TA-40	TA-40	TA-40	TA-60	TA-60	TA-60	TA-60	TR-40	TR-40	TR-40	TR-40	TR-60	TR-60	TR-60	TR-60
13	4,708	4,914	4,978	5,086	4,886	4,903	4,949	5,927	4,954	4,839	4,826	4,857	4,820	4,845	4,929	4,863	4,851	4,892	4,903
13	5,061	4,959	4,954	5,143	4,944	4,944	5,013	5,942	4,934	4,806	4,869	4,949	4,996	4,908	4,886	4,929	4,914	4,934	4,908
14	4,845	4,987	4,806	5,286	5,104	4,940	5,137	5,531	4,875	4,892	4,875	5,100	5,086	4,934	5,104	4,881	4,964	4,898	4,892
14	4,954	5,134	4,785	5,350	5,137	5,045	5,158	5,612	4,991	4,934	4,924	5,140	5,093	4,982	5,057	4,964	4,914	4,949	5,013
15	4,869	4,845	4,929	5,585	5,004	4,886	4,996	5,923	5,330	4,875	4,959	4,908	4,964	5,201	4,968	4,954	5,033	4,964	4,973
15	4,973	5,068	4,964	5,633	5,004	4,944	5,004	5,931	5,274	4,881	4,940	4,949	5,017	4,982	4,973	4,973	4,940	5,033	5,104
16	4,959	4,982	4,623	5,121	4,978	4,959	5,140	5,378	4,996	5,033	4,949	5,013	4,929	4,903	5,037	5,083	4,978	4,944	4,881
16	4,903	4,982	4,898	5,130	5,076	4,987	5,220	5,401	5,064	5,057	4,991	5,068	4,982	4,959	5,068	5,053	5,021	4,964	4,978
17	4,845	5,140	4,949	5,619	5,114	5,009	5,100	6,170	5,458	4,944	4,959	5,185	5,061	5,093	5,097	5,057	4,934	4,964	5,072
17	5,064	5,158	4,886	5,708	5,179	5,045	5,093	6,174	5,531	4,964	5,021	5,161	5,090	5,053	5,121	5,072	5,037	4,987	5,111
18	4,964	4,820	4,892	5,246	5,049	5,017	5,137	5,230	5,152	4,964	4,954	5,097	5,049	4,991	5,049	5,045	4,982	4,968	4,973
18	5,045	5,029	4,833	5,241	5,114	4,996	5,158	5,389	5,179	4,944	5,057	5,152	5,090	5,049	5,100	5,009	5,017	5,009	4,973

40: análisis a 40° C; 60: análisis a 60° C; AM: azul de metileno; AZ: azidiol; BR: bronopol; DP: dicromato potásico; FOE: método fluoro-opto-electrónico; MGG: May-Grünwald-Giemsa; PVM: pironina Y-verde de metilo; SC: sin conservante; TA: temperatura ambiente; TR: temperatura de refrigeración.

Nº Muestra	AM	MGG	PVM	FOE SC	FOE DP	FOE AZ	FOE BR	FOE SC	FOE DP	FOE AZ	FOE BR	FOE SC	FOE DP	FOE AZ	FOE BR	FOE SC	FOE DP	FOE AZ	FOE BR
				TA-40	TA-40	TA-40	TA-40	TA-60	TA-60	TA-60	TA-60	TR-40	TR-40	TR-40	TR-40	TR-60	TR-60	TR-60	TR-60
19	4,964	4,892	5,064	5,104	5,068	4,914	5,117	5,064	4,968	4,903	5,041	5,004	5,004	4,929	5,190	5,076	5,021	4,982	5,025
19	5,149	4,944	5,140	5,121	5,057	4,954	5,127	5,009	5,009	5,009	4,973	5,053	5,013	4,934	5,124	5,068	5,013	4,978	5,009
20	5,049	5,215	4,875	5,667	5,061	5,037	5,170	5,540	5,021	5,029	5,029	5,017	5,033	5,086	5,104	5,093	5,033	5,072	5,086
20	5,093	5,127	4,944	5,807	5,149	5,076	5,199	5,528	5,086	5,104	5,090	5,104	5,114	5,049	5,130	5,164	5,068	5,121	5,121
21	5,104	4,914	5,079	5,190	5,033	4,886	5,167	5,155	4,987	4,996	4,982	4,978	4,954	4,839	5,013	5,037	4,903	4,944	4,991
21	5,041	4,991	4,857	5,164	5,061	4,857	5,140	5,140	5,041	4,996	5,025	5,004	4,924	4,857	5,057	5,009	4,991	4,964	4,996
22	4,968	5,146	5,179	5,653	5,384	5,380	5,407	6,103	5,380	5,314	5,307	5,384	5,354	5,336	5,384	5,270	5,350	5,223	5,336
22	5,320	5,176	5,314	5,724	5,450	5,378	5,459	6,083	5,384	5,324	5,334	5,400	5,391	5,350	5,423	5,312	5,344	5,314	5,358
23	5,124	5,401	5,303	5,474	5,336	5,279	5,310	5,892	5,391	5,310	5,362	5,307	5,314	5,301	5,344	5,332	5,322	5,322	5,362
23	5,207	5,340	5,338	5,561	5,452	5,369	5,410	5,962	5,449	5,332	5,375	5,405	5,378	5,367	5,382	5,393	5,330	5,362	5,389
24	5,207	5,238	5,049	5,155	5,201	5,086	5,265	5,745	5,134	5,155	5,179	5,155	5,143	5,173	5,207	5,185	5,215	5,114	5,201
24	5,204	5,230	5,149	5,301	5,207	5,124	5,290	5,782	5,210	5,179	5,176	5,179	5,212	5,196	5,286	5,236	5,230	5,182	5,233

40: análisis a 40° C; 60: análisis a 60° C; AM: azul de metileno; AZ: azidiol; BR: bronopol; DP: dicromato potásico; FOE: método fluoro-opto-electrónico; MGG: May-Grünwald-Giemsa; PVM: pironina Y-verde de metilo; SC: sin conservante; TA: temperatura ambiente; TR: temperatura de refrigeración.

Nº Muestra	AM	MGG	PVM	FOE SC TA-40	FOE DP TA-40	FOE AZ TA-40	FOE BR TA-40	FOE SC TA-60	FOE DP TA-60	FOE AZ TA-60	FOE BR TA-60	FOE SC TR-40	FOE DP TR-40	FOE AZ TR-40	FOE BR TR-40	FOE SC TR-60	FOE DP TR-60	FOE AZ TR-60	FOE BR TR-60
25	5,307	5,212	5,301	5,121	5,217	5,068	5,272	5,215	5,238	5,201	5,236	5,061	5,152	5,061	5,212	5,220	5,167	5,182	5,220
25	5,193	5,276	5,225	5,199	5,265	5,079	5,246	5,238	5,196	5,228	5,243	5,097	5,107	5,009	5,241	5,230	5,238	5,248	5,225
26	5,279	5,274	5,299	5,417	5,312	5,201	5,310	5,841	5,544	5,253	5,223	5,276	5,265	5,207	5,281	5,250	5,250	5,310	5,290
26	5,330	5,236	5,320	5,623	5,324	5,220	5,338	5,853	5,639	5,248	5,233	5,272	5,253	5,207	5,270	5,276	5,279	5,310	5,338
27	5,258	5,530	5,276	5,471	5,423	5,338	5,435	5,724	5,420	5,380	5,405	5,498	5,401	5,412	5,455	5,474	5,459	5,417	5,467
27	5,356	5,524	5,373	5,525	5,468	5,382	5,491	5,840	5,462	5,398	5,422	5,480	5,449	5,442	5,452	5,430	5,480	5,435	5,453
28	5,334	5,332	5,225	5,428	5,299	5,250	5,338	ND	5,512	5,310	5,316	5,364	5,297	5,238	5,318	5,401	5,332	5,307	5,330
28	5,312	5,436	5,170	5,438	5,328	5,274	5,384	ND	5,585	5,297	5,371	5,356	5,316	5,348	5,391	5,438	5,428	5,382	5,367
29	5,371	5,334	5,297	5,641	5,354	5,373	5,396	5,985	5,509	5,408	5,413	5,519	5,405	5,365	5,362	5,500	5,386	5,369	5,412
29	5,276	5,422	5,373	5,652	5,452	5,425	5,393	6,025	5,571	5,265	5,420	5,539	5,375	5,405	5,428	5,547	5,405	5,465	5,352
30	5,491	5,389	5,418	5,624	5,417	5,312	5,398	5,936	5,386	5,364	5,389	5,340	5,413	5,369	5,373	5,358	5,365	5,377	5,380
30	5,373	5,405	5,393	5,657	5,433	5,326	5,405	5,907	5,422	5,393	5,367	5,354	5,389	5,350	5,340	5,378	5,425	5,398	5,412

40: análisis a 40° C; 60: análisis a 60° C; AM: azul de metileno; AZ: azidiol; BR: bronopol; DP: dicromato potásico; FOE: método fluoro-opto-electrónico; MGG: May-Grünwald-Giemsa; PVM: pironina Y-verde de metilo; SC: sin conservante; TA: temperatura ambiente; TR: temperatura de refrigeración.

Nº Muestra	AM	MGG	PVM	FOE SC	FOE DP	FOE AZ	FOE BR	FOE SC	FOE DP	FOE AZ	FOE BR	FOE SC	FOE DP	FOE AZ	FOE BR	FOE SC	FOE DP	FOE AZ	FOE BR
				TA-40	TA-40	TA-40	TA-40	TA-60	TA-60	TA-60	TA-60	TR-40	TR-40	TR-40	TR-40	TR-60	TR-60	TR-60	TR-60
31	5,539	5,543	5,425	5,502	5,425	5,403	5,479	5,825	5,396	5,369	5,377	5,418	5,396	5,367	5,369	5,348	5,367	5,384	5,407
31	5,483	5,498	5,420	5,548	5,420	5,420	5,508	5,851	5,453	5,433	5,422	5,436	5,377	5,387	5,412	5,400	5,384	5,427	5,405
32	5,509	5,543	5,560	5,521	5,599	5,436	5,579	5,582	5,545	5,508	5,545	5,378	5,484	5,365	5,540	5,526	5,542	5,529	5,531
32	5,560	5,509	5,566	5,502	5,591	5,418	5,583	5,555	5,568	5,520	5,583	5,386	5,490	5,387	5,554	5,565	5,580	5,554	5,615
33	5,580	5,524	5,565	5,676	5,624	5,579	5,621	6,047	5,621	5,540	5,588	5,589	5,603	5,579	5,619	5,594	5,625	5,600	5,607
33	5,567	5,585	5,519	5,679	5,656	5,553	5,680	6,047	5,644	5,591	5,621	5,585	5,656	5,614	5,649	5,646	5,652	5,607	5,648
34	5,560	5,576	5,502	ND	5,605	5,562	5,649	ND	5,528	5,533	5,562	5,471	5,456	5,446	5,551	5,540	5,524	5,522	5,525
34	5,607	5,551	5,620	ND	5,626	5,588	5,659	ND	5,535	5,576	5,562	5,487	5,464	5,456	5,561	5,542	5,511	5,539	5,559
35	5,631	5,602	5,551	ND	5,575	5,332	5,581	ND	5,522	5,412	5,553	5,442	5,425	5,456	5,515	5,468	5,516	5,508	5,568
35	5,598	5,623	5,637	ND	5,547	5,326	5,565	ND	5,542	5,431	5,576	5,442	5,410	5,479	5,508	5,446	5,528	5,525	5,583
36	5,626	5,665	5,676	5,874	5,652	5,500	5,617	ND	5,659	5,624	5,654	5,726	5,677	5,567	5,627	5,732	5,624	5,660	5,626
36	5,634	5,729	5,568	5,915	5,702	5,556	5,666	ND	5,745	5,632	5,685	5,776	5,675	5,632	5,677	5,757	5,659	5,630	5,655

40: análisis a 40° C; 60: análisis a 60° C; AM: azul de metileno; AZ: azidiol; BR: bronopol; DP: dicromato potásico; FOE: método fluoro-opto-electrónico; MGG: May-Grünwald-Giemsa; PVM: pironina Y-verde de metilo; SC: sin conservante; TA: temperatura ambiente; TR: temperatura de refrigeración.



N° Muestra	AM	MGG	PVM	FOE SC	FOE DP	FOE AZ	FOE BR	FOE SC	FOE DP	FOE AZ	FOE BR	FOE SC	FOE DP	FOE AZ	FOE BR	FOE SC	FOE DP	FOE AZ	FOE BR
				TA-40	TA-40	TA-40	TA-40	TA-60	TA-60	TA-60	TA-60	TR-40	TR-40	TR-40	TR-40	TR-60	TR-60	TR-60	TR-60
37	5,619	5,646	5,634	5,768	5,637	5,569	5,674	5,843	5,702	5,649	5,660	5,702	5,629	5,619	5,676	5,713	5,697	5,676	5,694
37	5,670	5,598	5,712	5,768	5,714	5,694	5,780	5,885	5,788	5,728	5,705	5,707	5,688	5,717	5,720	5,737	5,759	5,738	5,744
38	5,665	5,654	5,655	5,605	5,623	5,587	5,653	5,747	5,584	5,621	5,682	5,481	5,563	5,550	5,642	5,625	5,624	5,622	5,689
38	5,680	5,652	5,650	5,615	5,653	5,609	5,663	5,732	5,649	5,675	5,717	5,539	5,590	5,526	5,646	5,624	5,692	5,624	5,691
39	5,742	5,785	5,622	ND	5,623	5,465	5,646	ND	5,649	5,611	5,629	5,558	5,576	5,565	5,606	5,672	5,644	5,636	5,643
39	5,717	5,775	5,687	ND	5,661	5,520	5,702	ND	5,665	5,624	5,654	5,554	5,577	5,559	5,643	5,699	5,680	5,673	5,687
40	5,746	5,660	5,733	ND	5,555	5,373	5,609	ND	5,587	5,533	5,568	5,403	5,551	5,422	5,581	5,519	5,589	5,526	5,558
40	5,735	5,646	5,654	ND	5,618	5,407	5,626	ND	5,617	5,534	5,632	5,398	5,580	5,389	5,594	5,553	5,620	5,580	5,582
41	5,733	5,769	5,757	5,614	5,657	5,568	5,664	5,673	5,658	5,653	5,644	5,575	5,611	5,575	5,635	5,697	5,640	5,645	5,661
41	5,782	5,705	5,745	5,612	5,673	5,560	5,717	5,663	5,680	5,666	5,695	5,576	5,626	5,530	5,663	5,679	5,680	5,674	5,704
42	5,772	5,807	5,807	5,700	5,627	5,618	5,672	6,010	5,796	5,542	5,707	5,742	5,729	5,710	5,715	5,717	5,708	5,697	5,702
42	5,797	5,847	5,858	5,803	5,750	5,690	5,745	6,046	5,800	5,581	5,722	5,744	5,746	5,685	5,790	5,775	5,734	5,728	5,739

40: análisis a 40° C; 60: análisis a 60° C; AM: azul de metileno; AZ: azidiol; BR: bronopol; DP: dicromato potásico; FOE: método fluoro-opto-electrónico; MGG: May-Grünwald-Giemsa; PVM: pironina Y-verde de metilo; SC: sin conservante; TA: temperatura ambiente; TR: temperatura de refrigeración.

N° Muestra	AM	MGG	PVM	FOE SC	FOE DP	FOE AZ	FOE BR	FOE SC	FOE DP	FOE AZ	FOE BR	FOE SC	FOE DP	FOE AZ	FOE BR	FOE SC	FOE DP	FOE AZ	FOE BR
				TA-40	TA-40	TA-40	TA-40	TA-60	TA-60	TA-60	TA-60	TR-40	TR-40	TR-40	TR-40	TR-60	TR-60	TR-60	TR-60
43	5,783	5,786	5,782	ND	5,724	5,646	5,766	ND	5,736	5,740	5,763	5,652	5,696	5,630	5,752	5,740	5,715	5,755	5,762
43	5,787	5,740	5,814	ND	5,785	5,678	5,767	ND	5,732	5,756	5,766	5,642	5,708	5,658	5,751	5,788	5,779	5,785	5,763
44	5,776	5,713	5,752	5,362	5,748	5,450	5,723	5,700	5,688	5,609	5,705	5,314	5,594	5,408	5,677	5,648	5,687	5,701	5,693
44	5,799	5,567	5,808	5,394	5,735	5,446	5,741	5,707	5,695	5,631	5,736	5,260	5,642	5,400	5,697	5,671	5,693	5,702	5,726
45	5,838	5,864	5,834	ND	5,756	5,657	5,823	ND	5,766	5,785	5,816	5,573	5,773	5,605	5,831	5,808	5,805	5,794	5,820
45	5,785	5,937	5,914	ND	5,829	5,674	5,859	ND	5,760	5,813	5,839	5,561	5,780	5,591	5,829	5,826	5,820	5,837	5,841
46	5,848	5,823	5,834	5,723	5,696	5,599	5,674	6,091	5,726	5,704	5,751	5,643	5,667	5,658	5,675	5,710	5,747	5,694	5,750
46	5,794	5,766	5,775	5,781	5,743	5,704	5,751	6,097	5,726	5,751	5,756	5,684	5,684	5,686	5,733	5,713	5,763	5,736	5,753
47	5,818	5,753	5,862	5,773	5,748	5,679	5,744	5,831	5,695	5,677	5,757	5,660	5,708	5,698	5,723	5,719	5,703	5,723	5,763
47	5,863	5,757	5,843	5,813	5,767	5,687	5,761	5,816	5,729	5,667	5,741	5,697	5,695	5,692	5,750	5,719	5,763	5,740	5,779
48	5,861	5,777	5,765	5,667	5,716	5,593	5,750	5,838	5,678	5,733	5,760	5,589	5,665	5,574	5,730	5,677	5,736	5,679	5,748
48	5,823	5,772	5,816	5,718	5,744	5,593	5,766	5,806	5,732	5,719	5,749	5,593	5,713	5,563	5,745	5,729	5,766	5,734	5,758

40: análisis a 40° C; 60: análisis a 60° C; AM: azul de metileno; AZ: azidiol; BR: bronopol; DP: dicromato potásico; FOE: método fluoro-opto-electrónico; MGG: May-Grünwald-Giemsa; PVM: pironina Y-verde de metilo; SC: sin conservante; TA: temperatura ambiente; TR: temperatura de refrigeración.

N° Muestra	AM	MGG	PVM	FOE SC	FOE DP	FOE AZ	FOE BR	FOE SC	FOE DP	FOE AZ	FOE BR	FOE SC	FOE DP	FOE AZ	FOE BR	FOE SC	FOE DP	FOE AZ	FOE BR
				TA-40	TA-40	TA-40	TA-40	TA-60	TA-60	TA-60	TA-60	TR-40	TR-40	TR-40	TR-40	TR-60	TR-60	TR-60	TR-60
49	5,903	5,846	5,847	5,788	5,798	5,753	5,815	5,751	5,772	5,741	5,812	5,713	5,786	5,769	5,779	5,752	5,797	5,757	5,831
49	5,808	5,807	5,801	5,794	5,843	5,769	5,829	5,713	5,807	5,760	5,845	5,736	5,759	5,780	5,810	5,760	5,819	5,769	5,855
50	5,877	5,840	5,914	5,805	5,851	5,789	5,834	5,848	5,876	5,858	5,877	5,708	5,846	5,724	5,855	5,859	5,899	5,846	5,865
50	5,873	5,938	5,935	5,799	5,898	5,792	5,873	5,879	5,895	5,840	5,926	5,714	5,865	5,740	5,861	5,857	5,890	5,895	5,882
51	5,878	5,918	5,899	ND	5,872	5,750	5,879	ND	5,840	5,831	5,849	5,740	5,840	5,779	5,862	5,850	5,861	5,854	5,867
51	5,908	5,938	5,881	ND	5,900	5,814	5,886	ND	5,890	5,866	5,886	5,732	5,822	5,757	5,848	5,901	5,873	5,876	5,911
52	5,885	5,885	5,901	5,838	5,805	5,774	5,825	6,397	5,857	5,826	5,859	5,832	5,838	5,813	5,823	5,888	5,847	5,816	5,797
52	5,971	5,932	5,883	5,899	5,871	5,846	5,847	6,407	5,873	5,874	5,889	5,832	5,818	5,838	5,846	5,859	5,914	5,848	5,859
53	5,926	5,983	5,923	ND	5,940	5,744	5,937	5,878	5,882	5,839	5,943	5,828	5,930	5,794	5,935	5,874	5,957	5,868	5,923
53	5,996	6,053	5,978	ND	5,927	5,782	5,954	5,859	5,900	5,853	5,968	5,825	5,917	5,777	5,953	5,909	5,937	5,921	5,943
54	5,933	6,071	6,033	5,943	5,947	6,001	5,982	6,025	6,005	5,989	5,990	5,981	5,913	5,960	5,939	6,008	6,020	6,008	6,001
54	6,034	6,037	6,006	5,978	6,038	5,986	5,989	6,054	6,041	6,074	6,042	5,988	5,985	5,975	5,947	6,060	6,030	6,071	6,088

40: análisis a 40° C; 60: análisis a 60° C; AM: azul de metileno; AZ: azidiol; BR: bronopol; DP: dicromato potásico; FOE: método fluoro-opto-electrónico; MGG: May-Grünwald-Giemsa; PVM: pironina Y-verde de metilo; SC: sin conservante; TA: temperatura ambiente; TR: temperatura de refrigeración.

N° Muestra	AM	MGG	PVM	FOE	FOE	FOE	FOE	FOE	FOE	FOE	FOE	FOE	FOE	FOE	FOE	FOE	FOE	FOE	FOE
				SC	DP	AZ	BR	SC	DP	AZ	BR	SC	DP	AZ	BR	SC	DP	AZ	BR
				TA-40	TA-40	TA-40	TA-40	TA-60	TA-60	TA-60	TA-60	TR-40	TR-40	TR-40	TR-40	TR-60	TR-60	TR-60	TR-60
55	6,024	5,981	5,958	5,933	5,892	5,791	5,893	ND	5,831	5,842	5,904	5,777	5,872	5,792	5,873	5,892	5,883	5,879	5,918
55	5,980	5,979	5,948	5,952	5,916	5,795	5,912	ND	5,889	5,862	5,931	5,769	5,847	5,778	5,885	5,924	5,924	5,903	5,969
56	5,968	5,990	6,050	5,889	5,928	5,859	5,956	6,002	5,957	5,964	6,005	5,812	5,872	5,892	5,944	5,952	5,985	5,963	5,987
56	6,061	5,993	5,997	5,934	5,958	5,919	5,979	5,996	6,009	5,977	6,028	5,828	5,888	5,874	5,959	5,975	6,002	5,976	6,009
57	6,067	6,031	5,982	5,908	5,937	5,903	5,987	5,930	5,940	5,950	5,996	5,870	5,943	5,918	5,973	5,951	5,975	5,967	6,005
57	6,003	6,012	5,992	5,927	5,993	5,928	5,999	5,968	6,002	5,969	6,023	5,881	5,933	5,915	5,984	6,000	6,021	5,980	5,979
58	6,112	6,043	6,033	6,029	6,048	5,941	6,039	6,036	5,964	6,037	6,020	5,929	6,010	5,942	6,048	6,018	6,024	6,033	5,999
58	6,143	6,088	6,077	6,056	6,056	5,965	6,083	6,055	5,979	6,049	6,052	5,949	6,012	5,953	6,044	6,044	6,046	6,048	6,029
59	6,166	6,212	6,160	6,076	6,122	6,028	6,106	6,125	6,118	6,138	6,178	6,001	6,043	6,028	6,128	6,121	6,123	6,123	6,148
59	6,188	6,180	6,210	6,140	6,139	6,053	6,185	6,134	6,139	6,166	6,193	5,999	6,046	6,032	6,125	6,139	6,153	6,121	6,167
60	6,175	6,245	6,229	6,118	6,092	6,087	6,128	6,267	6,178	6,184	6,212	6,123	6,143	6,130	6,166	6,198	6,188	6,217	6,215
60	6,214	6,208	6,202	6,226	6,195	6,150	6,232	6,266	6,199	6,214	6,220	6,177	6,174	6,171	6,188	6,236	6,186	6,237	6,245

40: análisis a 40° C; 60: análisis a 60° C; AM: azul de metileno; AZ: azidiol; BR: bronopol; DP: dicromato potásico; FOE: método fluoro-opto-electrónico; MGG: May-Grünwald-Giemsa; PVM: pironina Y-verde de metilo; SC: sin conservante; TA: temperatura ambiente; TR: temperatura de refrigeración.

Nº Muestra	AM	MGG	PVM	FOE SC	FOE DP	FOE AZ	FOE BR	FOE SC	FOE DP	FOE AZ	FOE BR	FOE SC	FOE DP	FOE AZ	FOE BR	FOE SC	FOE DP	FOE AZ	FOE BR
				TA-40	TA-40	TA-40	TA-40	TA-60	TA-60	TA-60	TA-60	TR-40	TR-40	TR-40	TR-40	TR-60	TR-60	TR-60	TR-60
61	6,201	6,196	6,178	6,087	6,115	6,027	6,082	6,301	6,125	6,133	6,140	6,092	6,069	6,056	6,129	6,118	6,148	6,130	6,136
61	6,195	6,151	6,184	6,171	6,136	6,098	6,151	6,291	6,178	6,155	6,196	6,141	6,136	6,077	6,137	6,181	6,186	6,162	6,175
62	6,192	6,221	6,175	5,873	5,939	5,950	6,027	ND	6,154	6,110	6,054	6,087	6,100	6,039	6,086	6,052	6,100	6,070	6,078
62	6,208	6,217	6,197	5,945	6,074	6,010	6,118	ND	6,168	6,089	6,078	6,138	6,094	6,084	6,132	6,118	6,104	6,143	6,115
63	6,207	6,150	6,227	6,167	6,120	6,089	6,181	6,157	6,176	6,150	6,240	6,097	6,104	6,107	6,172	6,181	6,184	6,184	6,193
63	6,202	6,264	6,209	6,145	6,150	6,133	6,205	6,221	6,183	6,195	6,230	6,097	6,124	6,124	6,206	6,199	6,220	6,223	6,205
64	6,224	6,293	6,192	6,029	6,156	5,996	6,149	6,208	6,166	6,172	6,202	5,911	6,027	5,984	6,094	6,189	6,192	6,179	6,201
64	6,279	6,291	6,253	6,024	6,216	6,037	6,209	6,246	6,208	6,214	6,226	5,906	6,021	6,001	6,082	6,207	6,212	6,190	6,233
65	6,262	6,266	6,284	6,253	6,198	6,158	6,241	6,321	6,211	6,214	6,268	6,080	6,198	6,120	6,222	6,226	6,220	6,221	6,266
65	6,291	6,300	6,317	6,270	6,264	6,184	6,270	6,352	6,238	6,249	6,295	6,076	6,241	6,125	6,235	6,251	6,259	6,250	6,276
66	6,292	6,367	6,269	6,196	6,222	6,218	6,272	6,279	6,249	6,263	6,298	6,149	6,212	6,221	6,263	6,270	6,276	6,277	6,291
66	6,294	6,322	6,279	6,204	6,255	6,241	6,302	6,282	6,303	6,275	6,325	6,135	6,217	6,217	6,295	6,288	6,322	6,296	6,322

40: análisis a 40° C; 60: análisis a 60° C; AM: azul de metileno; AZ: azidiol; BR: bronopol; DP: dicromato potásico; FOE: método fluoro-opto-electrónico; MGG: May-Grünwald-Giemsa; PVM: pironina Y-verde de metilo; SC: sin conservante; TA: temperatura ambiente; TR: temperatura de refrigeración.

Nº Muestra	AM	MGG	PVM	FOE SC	FOE DP	FOE AZ	FOE BR	FOE SC	FOE DP	FOE AZ	FOE BR	FOE SC	FOE DP	FOE AZ	FOE BR	FOE SC	FOE DP	FOE AZ	FOE BR
				TA-40	TA-40	TA-40	TA-40	TA-60	TA-60	TA-60	TA-60	TR-40	TR-40	TR-40	TR-40	TR-60	TR-60	TR-60	TR-60
67	6,317	6,309	6,308	6,126	6,256	6,149	6,254	6,225	6,223	6,227	6,265	6,108	6,211	6,140	6,226	6,234	6,241	6,229	6,255
67	6,314	6,313	6,314	6,111	6,268	6,193	6,300	6,249	6,250	6,292	6,296	6,106	6,223	6,154	6,252	6,263	6,274	6,252	6,273
68	6,302	6,362	6,349	6,316	6,335	6,236	6,309	6,151	6,312	6,331	6,370	6,031	6,131	6,161	6,186	6,330	6,360	6,331	6,382
68	6,435	6,336	6,439	6,354	6,360	6,236	6,317	6,315	6,391	6,341	6,409	5,988	6,116	6,123	6,171	6,354	6,414	6,346	6,398
69	6,505	6,523	6,535	6,456	6,363	6,348	6,446	ND	6,458	6,493	6,526	6,202	6,318	6,328	6,368	6,488	6,485	6,488	6,513
69	6,525	6,512	6,545	6,463	6,484	6,419	6,496	ND	6,509	6,504	6,554	6,185	6,313	6,325	6,359	6,494	6,518	6,522	6,562
70	6,521	6,556	6,543	6,363	6,395	6,373	6,487	6,512	6,537	6,527	6,526	6,519	6,459	6,440	6,496	6,478	6,510	6,513	6,516
70	6,535	6,527	6,553	6,487	6,496	6,463	6,529	6,565	6,552	6,556	6,587	6,472	6,486	6,471	6,504	6,518	6,553	6,533	6,542
71	6,560	6,567	6,554	6,440	6,408	6,362	6,461	ND	6,501	6,483	6,543	6,056	6,322	6,277	6,393	6,495	6,520	6,505	6,528
71	6,523	6,545	6,562	6,505	6,463	6,409	6,503	ND	6,532	6,523	6,555	6,040	6,295	6,266	6,395	6,525	6,541	6,529	6,551
72	6,612	6,572	6,588	6,514	6,525	6,492	6,537	6,601	6,551	6,584	6,557	6,342	6,493	6,453	6,490	6,587	6,584	6,571	6,606
72	6,604	6,599	6,611	6,545	6,582	6,530	6,580	6,627	6,583	6,612	6,656	6,331	6,498	6,466	6,515	6,611	6,604	6,613	6,637

40: análisis a 40° C; 60: análisis a 60° C; AM: azul de metileno; AZ: azidiol; BR: bronopol; DP: dicromato potásico; FOE: método fluoro-opto-electrónico; MGG: May-Grünwald-Giemsa; PVM: pironina Y-verde de metilo; SC: sin conservante; TA: temperatura ambiente; TR: temperatura de refrigeración.

N° Muestra	AM	MGG	PVM	FOE SC	FOE DP	FOE AZ	FOE BR	FOE SC	FOE DP	FOE AZ	FOE BR	FOE SC	FOE DP	FOE AZ	FOE BR	FOE SC	FOE DP	FOE AZ	FOE BR
				TA-40	TA-40	TA-40	TA-40	TA-60	TA-60	TA-60	TA-60	TR-40	TR-40	TR-40	TR-40	TR-60	TR-60	TR-60	TR-60
73	6,673	6,725	6,688	6,584	6,654	6,615	6,657	6,647	6,684	6,684	6,698	6,657	6,646	6,637	6,681	6,654	6,680	6,667	6,692
73	6,662	6,698	6,648	6,615	6,682	6,646	6,683	6,689	6,714	6,729	6,735	6,681	6,674	6,656	6,683	6,692	6,713	6,704	6,721
74	6,701	6,641	6,604	6,601	6,554	6,512	6,621	6,577	6,532	6,577	6,609	6,388	6,549	6,481	6,578	6,563	6,575	6,567	6,605
74	6,656	6,644	6,630	6,589	6,581	6,519	6,618	6,567	6,558	6,616	6,640	6,379	6,540	6,475	6,578	6,594	6,594	6,593	6,636
75	6,712	6,704	6,715	6,697	6,676	6,668	6,714	6,760	6,664	6,686	6,759	6,663	6,701	6,660	6,666	6,698	6,710	6,714	6,722
75	6,691	6,687	6,708	6,728	6,709	6,693	6,768	6,794	6,697	6,725	6,777	6,696	6,716	6,683	6,682	6,729	6,731	6,741	6,760
76	6,693	6,733	6,700	6,569	6,636	6,591	6,667	6,661	6,642	6,681	6,710	6,434	6,555	6,561	6,616	6,680	6,679	6,678	6,707
76	6,722	6,686	6,726	6,638	6,674	6,618	6,703	6,662	6,683	6,710	6,766	6,404	6,574	6,582	6,613	6,708	6,716	6,715	6,733
77	6,751	6,770	6,707	6,654	6,639	6,601	6,697	6,821	6,712	6,738	6,730	6,686	6,684	6,655	6,723	6,705	6,719	6,716	6,719
77	6,777	6,747	6,697	6,722	6,703	6,680	6,748	6,843	6,741	6,776	6,730	6,709	6,696	6,678	6,725	6,737	6,746	6,744	6,757
78	6,876	6,866	6,837	6,642	6,862	6,858	6,852	6,829	6,820	6,862	6,874	6,468	6,735	6,791	6,830	6,823	6,873	6,844	6,888
78	6,902	6,855	6,854	6,625	6,867	6,857	6,845	6,837	6,844	6,857	6,869	6,614	6,733	6,793	6,831	6,858	6,878	6,883	6,904

40: análisis a 40° C; 60: análisis a 60° C; AM: azul de metileno; AZ: azidiol; BR: bronopol; DP: dicromato potásico; FOE: método fluoro-opto-electrónico; MGG: May-Grünwald-Giemsa; PVM: pironina Y-verde de metilo; SC: sin conservante; TA: temperatura ambiente; TR: temperatura de refrigeración.

N° Muestra	AM	MGG	PVM	FOE	FOE	FOE	FOE	FOE	FOE	FOE	FOE	FOE	FOE	FOE	FOE	FOE	FOE	FOE	FOE	FOE	
				SC	DP	AZ	BR	SC	DP	AZ	BR	SC	DP	AZ	BR	SC	DP	AZ	BR		
				TA-40	TA-40	TA-40	TA-40	TA-60	TA-60	TA-60	TA-60	TR-40	TR-40	TR-40	TR-40	TR-60	TR-60	TR-60	TR-60	TR-60	TR-60
79	7,062	7,110	7,116	7,069	7,046	7,042	7,118	7,062	7,056	7,108	7,121	7,089	7,078	7,052	7,085	7,105	7,072	7,120	7,106		
79	7,106	7,060	7,098	7,081	7,072	7,057	7,136	7,092	7,078	7,129	7,141	7,106	7,083	7,069	7,093	7,077	7,108	7,099	7,106		
80	7,285	7,373	7,306	7,356	7,329	7,309	7,390	7,372	7,336	7,391	7,446	7,372	7,319	7,365	7,421	7,400	7,450	7,429	7,393		
80	7,318	7,355	7,291	7,395	7,360	7,379	7,433	7,421	7,360	7,424	7,463	7,366	7,369	7,396	7,422	7,409	7,453	7,450	7,462		

**40:** análisis a 40° C; **60:** análisis a 60° C; **AM:** azul de metileno; **AZ:** azidiol; **BR:** bronopol; **DP:** dicromato potásico; **FOE:** método fluoro-opto-electrónico; **MGG:** May-Grünwald-Giemsa; **PVM:** pironina Y-verde de metilo; **SC:** sin conservante; **TA:** temperatura ambiente; **TR:** temperatura de refrigeración.