



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
Facultad de Ciencias Veterinarias

Facultad de Ciencias Agrarias
Instituto de Ciencia y Tecnología de
Alimentos

**Determinación de Células Somáticas en Calostro Post-Parto de vacas
de lechería mediante dos métodos de recuento**

**Tesis de grado presentada como parte de
los requisitos para optar al Grado de
LICENCIADO EN MEDICINA VETERINARIA**

Carlos Rodrigo Kutscher Lagos
Valdivia Chile 1998

A MIS PADRES

INDICE

	Pág.
1. RESUMEN.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. INTRODUCCION.....	3
4. MATERIAL Y METODO.....	9
5. RESULTADOS.....	12
6. DISCUSION.....	16
7. BIBLIOGRAFIA.....	21
8. ANEXOS.....	26
AGRADECIMIENTOS.....	32

1. RESUMEN

En el presente trabajo se determinó el contenido de células somáticas del calostro, aplicando un sistema de muestreo diario desde el primer día post-parto hasta el séptimo día posterior al mismo.

Se obtuvieron las muestras correspondientes a la ordeña completa de 10 vacas Holando-frisonas, sin alteraciones clínicas evidentes, pertenecientes al predio Vista Alegre de la Universidad Austral de Chile, entre Junio y Agosto de 1996. Las muestras fueron analizadas mediante los métodos de Recuento Microscópico Directo (RMD) y Recuento Celular Electrónico de partículas (RCE).

Se determinaron las tendencias para los valores de los métodos a medida que avanzaba la lactancia, desde el primero al séptimo día post-parto. Además se efectuaron análisis de varianza entre los diferentes días y de correlación entre los dos métodos empleados en el estudio.

El coeficiente de correlación entre los métodos al tomar el total de datos tuvo un valor de 0,05, pero al eliminar los datos correspondientes al primer día post-parto la correlación aumentó significativamente a 0,95 ($p < 0,05$).

Las tendencias para ambos métodos de recuento de células somáticas fueron en disminución a medida que avanzaba la lactancia.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir que para las muestras del presente estudio según los métodos utilizados, el contenido celular del calostro disminuye a medida que la lactancia avanza y adquiere las características de la leche.

Palabras claves: vaca, calostro, recuento de células somáticas.

2. SUMMARY

The main purpose of the research was the determination of the somatic cell content in colostrum, by means of two methodologies: Direct Microscopic Count (DMC) and Electronic Cell Count (ECC). A daily sampling system was applied.

Ten Holstein-Friesians cows without evident clinic signs were sampled from a herd belonging to the Universidad Austral de Chile, Vista Alegre dairy farm. Period of sampling was between June and August 1996.

Analysis of variance and correlation coefficients between both analytical methods and between days were determined.

A correlation coefficient between both methods, when all data was considered, was as low as 0,05. When eliminating first data collected, the correlation significantly increased to 0,95.

According to results, the cell content of colostrum diminishes through lactation, in the same manner as secretion acquires the characteristics of milk.

Key words: cow, colostrum, somatic cell counts.

3. INTRODUCCION

3.1. Generalidades.

El calostro ha sido definido por diferentes autores, pero en general se le considera como la secreción mamaria inicial posterior al parto, la cual es manifiestamente distinta de la leche en su composición (Reece, 1991). Su proceso de formación comienza alrededor de 15 días antes del parto y concluye aproximadamente cuatro días posterior al mismo (Smith y Todhunter, 1982).

Esta secreción es considerada como la primera leche que produce la madre y posee una cantidad mucho mayor de proteína que la leche normal (especialmente albúminas y globulinas). Debido a que contiene anticuerpos contra las enfermedades a que ha estado expuesta la vaca, es de suma importancia que el recién nacido la ingiera, de este modo los animales jóvenes obtienen inmunidad pasiva que los protege hasta que puedan desarrollar sus propios anticuerpos (Frandsen, 1992). En sus caracteres externos difiere notablemente del aspecto de la leche normal. Su color va de amarillento a parduzco, es de consistencia viscosa, emite un olor peculiar, suele tener sabor salobre, reacción débilmente ácida, siendo muy rico en enzimas, sobre todo en catalasa. Coagula al ser sometido a ebullición y por la prueba del alcohol; al someterlo a decantación se divide en dos capas, la superior más opaca y la inferior más clara (Rosell y Dos Santos, 1952). El calostro gradualmente se va transformando en la leche de composición normal, en el transcurso de aproximadamente una semana (FAO, 1981), y su contenido celular se normaliza en los primeros cinco a ocho días post-parto (Lerche, 1969).

Es considerada como una secreción no apta para el consumo humano y su incorporación a la leche está prohibida. Así lo establece FAO (1981) en su definición para leche la cual señala: "Leche, sin otra denominación, es el producto íntegro y fresco de la ordeña completa de una o varias vacas, sanas, bien alimentadas y en reposo, exenta de calostro y que cumpla con los caracteres físicos y bacteriológicos que se establecen". Estas características son especificadas en base a diversos valores tales como densidad, índices crioscópico y de refracción, acidez titulable, grasa y sólidos no grasos, cantidad de leucocitos, gérmenes patógenos y presencia de antisépticos, antibióticos y sustancias alcalinas.

Los decretos que rigen la calidad de la leche en Chile son el Decreto 271 (Ministerio de Agricultura, 1978), sobre control y clasificación de leche según calidad, y el Decreto 178 (Ministerio de Agricultura, 1979), que establece el reglamento específico para la determinación de la calidad de leche cruda. En ambos se especifica que la leche de consumo humano debe estar exenta de calostro.

Esta prohibición radica en importantes razones, ya que el calostro no sólo deteriora las características organolépticas de la leche por el alto contenido de cloruros y bajo contenido de caseína que posee (FAO, 1984), sino que además hace que ésta coagule fácilmente durante los tratamientos térmicos (FAO, 1981).

Actualmente en Chile, el momento exacto en que la secreción mamaria va al consumo humano (aproximadamente al cuarto día post-parto) depende de evaluaciones muy subjetivas, efectuadas por las personas encargadas de la lechería, las cuales se basan sólo en características organolépticas como color, olor y consistencia. Al respecto FAO (1984) menciona que su presencia en bajas concentraciones en la leche recogida no modifica las características organolépticas de la mezcla y por consiguiente no puede detectarse por análisis sensorial.

Los estudios referentes a los recuentos celulares en calostro no se han analizado con precisión, y la literatura respecto al tema es bastante escasa (¹ Concha, 3997), encontrándose información sólo en algunos trabajos referentes a relacionar mastitis con el contenido celular y bacteriano de la secreción mamaria, puesto que tanto en el período seco como en el periparturiente la glándula mamaria está más expuesta a contraer nuevas infecciones.

3.2. Fisiología y mecanismos de defensa celulares de la glándula mamaria.

Las secreciones mamarias bovinas contienen varios tipos de leucocitos: polimorfonucleares (PMN), linfocitos y macrófagos (Lee y col., 1980; Jensen y Eberhart, 1981; Mc Donald y Anderson, 1981a). Las células epiteliales constituyen menos de un 2% del número total de células somáticas de la leche de la vaca (Lee y col., 1980), pero en las cuatro primeras semanas de lactancia pueden superar el 15% (Miller y col., 1993).

La composición de los tres mayores tipos celulares, PMN, linfocitos y macrófagos varía en su número total de vaca a vaca y dentro de un mismo animal, dependiendo de la etapa de lactancia y de la salud de la glándula mamaria (Burvenich y col., 1995; Watson, 1980). Consecuentemente, cuando se estudian células de las secreciones mamarias de la vaca, cada parte del ciclo de lactancia debe ser considerado.

De acuerdo a Smith y Todhunter (1982), el ciclo de lactancia de las vacas consta de dos períodos fisiológicos: 1) El período de lactancia, que va desde el fin del período calostrado hasta el secado y 2) El período seco, que es el período entre el secado y el calostro.

¹ Comunicación personal, Carlos Concha, MV, MSc. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Suecia.

Durante el periodo de lactancia, la función primaria de la glándula mamaria es sintetizar y secretar continuamente leche (Concha, 1986). En este período, la leche proveniente de glándulas mamarias bovinas normales contiene, en promedio, $2,0 \times 10^5$ células somáticas por ml consistentes en aproximadamente un 12% PMN, un 60% de macrófagos, y un 28% de linfocitos (Lee y col., 1980). Al respecto, distintos autores señalan que los recuentos celulares son ligeramente superiores durante la lactancia temprana y tardía (Miller y col., 1993, Concha y col., 1980; Sheldrake y col., 1983), y por otro lado, en glándulas normales no infectadas, los recuentos celulares son menores a $1,0 \times 10^6$ a lo largo de la mediana lactancia. Sin embargo, en infecciones subclínicas, los recuentos celulares aumentan a $6,0 \times 10^6$ hacia el final de la lactancia (Burvenich y col., 1995).

Durante la lactancia tardía, el porcentaje de PMN tiende a aumentar al tiempo que el porcentaje de linfocitos disminuye (Mc Donald y Anderson 1981a y b; Miller y col., 1990). Los PMN son el tipo celular predominante durante las primeras cuatro semanas después del cese de la ordeña, seguido por los macrófagos y linfocitos (Jensen y Eberhart 1981; Miller y col., 1991).

Estudios realizados por Schalm y col. (1976) sugieren la importancia de los PMN en la defensa de la glándula mamaria. En la glándula sana estas células tienen la capacidad de migrar desde la sangre periférica, a través de uniones endoteliales, hacia la leche. La lactancia o los estímulos mamarios inducen la migración directa de los PMN al tejido mamario (Paape y col., 1992b); de esta manera, la glándula mamaria normal estéril es apoyada con una constante fuente de PMN. Sin embargo, una vez en el lumen de los alvéolos, la ingestión de grasas y caseína causa una pérdida en funciones fagocíticas y bactericidas y los lleva a la muerte (Paape y Wergin, 1977).

La ordeña remueve a los PMN dañados, siendo estos reemplazados por PMN sanos, mejorando así la defensa contra la infección bacteriana. Este fenómeno puede explicar la reducida incidencia de mastitis clínica de las vacas ordeñadas cuatro veces al día cuando se comparan con vacas ordeñadas dos veces al día (Hillerton, 1990).

En animales sanos, la producción y destrucción de PMN está estrechamente regulada, lo cual mantiene constante su número en la sangre, leche y tejidos (Jain, 1986). Los PMN maduran en la médula ósea y son liberados a la circulación, donde ellos pasan aproximadamente nueve horas antes de migrar a un tejido (Carlson y Kaneko, 1975). La diapédesis de los PMN al tejido mamario ocurre a un bajo nivel. Estos son viables en la glándula mamaria por uno a dos días, y los más envejecidos pasan a ser células programadas para morir (fenómeno de apoptosis) antes de la ingestión por macrófagos (Savill y col., 1993). Lo indicado previene la desintegración de los PMN, lo cual puede causar la liberación de sustancias tóxicas provocando daño en el tejido mamario (Burvenich y col., 1995).

Durante el período seco, la funcionalidad de la glándula mamaria puede ser caracterizada mediante tres distintos y progresivos estados:

a) Período de activa involución; o también llamado período seco temprano. Esta etapa se inicia con el cese de la ordeña al final de la lactancia; si bien la glándula mamaria continúa secretando y sintetizando leche, la cual se acumula en la glándula, el volumen del fluido disminuye significativamente al decimosexto día posterior al secado (Wheelock y col., 1967). El período seco temprano finaliza alrededor de los 28 días (Jensen y Eberhart, 1981).

Diversos autores han informado aumentos en los recuentos celulares de $1,8 \times 10^7$ células/mi el séptimo día del período seco temprano. Estos altísimos recuentos son seguidos por menores concentraciones en los días 14 y 21 y por otro aumento ($1,5 \times 10^7$ células/mi) entre los días 21 y 28 (Jensen y Eberhart, 1981). Los mayores tipos celulares presentes en la secreción del período seco temprano de la glándula mamaria bovina fueron macrófagos, linfocitos y PMN, y al final del periodo seco temprano ellos representaron aproximadamente 43%, 38% y 19% de las células respectivamente (Lee y col., 1980; Me Donald y Anderson, 1981a).

b) Período de involución estacionaria. Durante los períodos secos de 60 días o mayor, el estado de involución estacionaria se extiende por alrededor de 18 días. El volumen de fluido en la ubre durante este período se mantiene a niveles muy bajos, correspondiendo a unos pocos mililitros (Wheelock y col., 1967; Me Donald y Anderson, 1981a y b). El número total de células en una glándula mamaria no infectada en este lapso varía entre $2,5$ a $3,0 \times 10^6$ /mi (Concha y col., 1980; Me Donald y Anderson, 1981b), consistentes en alrededor de un 45% de macrófagos, 40% de linfocitos y 15% de PMNL (Jensen y Eberhart, 1981; Me Donald y Anderson, 1981b).

c) Período de calostrogénesis. Comienza alrededor de 15 días antes del parto y finaliza alrededor de tres días posterior al mismo. De acuerdo a Smith y Todhunter (1982), la glándula mamaria comienza nuevamente su desarrollo durante el período seco tardío, el cual está caracterizado principalmente por la formación y acumulación de calostro con altas concentraciones de inmunoglobulinas (Watson, 1980), por otra parte las concentraciones de grasa, caseína, lactosa y otros componentes en la secreción, comienzan a aumentar aproximadamente dos semanas antes del parto. Durante este tiempo el fluido de la cisterna de la glándula se incrementa levemente, pero copiosas cantidades de secreción son acumuladas a partir del tercer día pre-parto (Hartman, 1973).

El número de células en el calostro de una glándula mamaria no infectada, declina gradualmente a partir de la segunda semana previo al parto, con recuentos celulares entre $1,0 \times 10^6$ y $2,7 \times 10^6$ pocos días antes del mismo (Jensen y Eberhart, 1981; Me Donald y Anderson, 1981 b). Además, los mismos autores comprobaron una disminución en los recuentos celulares, con valores de $1,0 \times 10^5$ a $2,8 \times 10^5$ células/ml alrededor de una semana post-parto.

Durante la calostrogénesis las células constan de aproximadamente 50% de macrófagos, 25% de linfocitos y 25% de PMN, pero al cabo de una semana post-parto la proporción de macrófagos disminuye en favor de los PMN, con lo cual ambos tipos de células representan alrededor de un 37% hacia el día siete post-parto (Jensen y Eberhart, 1981).

3.3 Incidencia y severidad de la mastitis y etapa de lactancia.

La mastitis es usualmente consecuencia de infecciones bacterianas, siendo responsable de importantes pérdidas económicas a la industria lechera, puesto que disminuye la producción, aparte de las modificaciones composicionales (Schalm y col., 1971). La enfermedad puede estar presente en una forma clínica que es fácilmente detectada por el ordeñador (Robinson, 1981), y para Chile se estima que esta forma de la enfermedad, no representa más del 2% como promedio para las lecherías (Zurita, 1988b). Además, puede presentarse como una mastitis subclínica, que sólo es diagnosticada por la presencia de bacterias patógenas o por un incremento en el recuento de células somáticas (Robinson, 1981; Zurita, 1988a). Para el país se estima que más del 70% de las vacas y 45% de los cuartos mamarios en producción se encuentran afectados por algún grado de mastitis (Zurita, 1988b).

Los períodos en que la glándula mamaria es más susceptible a contraer neoinfecciones son tanto al momento del secado como durante el período periparturiento (Me Donald y Anderson, 1981a y b; Oliver y Mitchell, 1983), a pesar de existir un aumento en las concentraciones de inmunoglobulinas (Ig) al momento del secado, con un adicional incremento sólo previo al parto, que debiera proteger a la glándula contra las infecciones (Burvenich y col., 1995). Esto ha sido atribuido, en parte, a una disminución en las secreciones lácteas que contienen elementos celulares capaces de realizar la fagocitosis en glándulas con avanzada involución (Paape y col., 1992a y b). A su vez, Targowski y Niemialtowski (1986), sugirieron que este fenómeno ocurría por la formación de complejos inmunes que bloqueaban los receptores Fe sobre los PMN. Además, la alta cantidad de lactoferrina en la glándula mamaria, tanto en el período seco como en la calostrogénesis (Sordillo y col., 1987), debido a su alta afinidad por IgG2 (Butler, 1973), pudiera también explicar en parte la baja en la capacidad opsónica de las secreciones secas y calostrales.

3.4. Situación lechera chilena.

La industria lechera chilena ha venido experimentando una acelerada tasa de crecimiento en lo que se refiere a recepción de leche en los últimos diez años, llegando en 1996 a la cifra de 1.406 millones de litros; equivalente a un 3,6% de mayor producción que el año 1995 (Agroanálisis, 1997). Se espera un crecimiento a nivel nacional de 10% a un 15%, para 1997. De alcanzarse este porcentaje, la oferta de leche en plantas se aproximará a 1.600 millones de litros con un aumento cercano a los 200 millones de litros por sobre el volumen de 1996.

De lo antes mencionado, se puede establecer que si se mantiene esta constante tasa de crecimiento en la producción lechera, se podría superar el autoabastecimiento interno dentro de poco, llegando a disponer de excedentes en la producción, los que deberán ser incorporados hacia nuevos mercados, por ejemplo hacia los países que integran el NAFTA y el MERCOSUR.

Para pretender ingresar sus productos lácteos a tales mercados. Chile deberá acreditar el cumplimiento de normas de calidad, como son las Normas ISO 9000 y el Análisis de Riesgo y Control de Puntos Críticos (HACCP) junto con otros dictámenes de la Comunidad Económica Europea (CEE), debiendo competir con los nuevos estándares de calidad composicionales e higiénicos, tanto de los productos lácteos como de la leche empleada en su elaboración.

Esta investigación, siendo parte del proyecto titulado "Modelación de la variación estacional y regional de la leche cruda en las regiones VIII a X", está financiada por el Fondo Nacional de Desarrollo de la Ciencia y Tecnología ² (FONDECYT), e intentará proporcionar antecedentes para elaborar un sistema de apoyo a los productores y empresas lácteas en lo referente a determinación de la calidad de la leche cruda, así como para mejorar los sistemas de control y determinación de calidad de la misma.

El presente trabajo tiene como objetivos:

- a) Determinar en el calostro post-parto de vacas lecheras los valores para los recuentos de células somáticas mediante los siguientes métodos:
 - 1) Recuento Celular Electrónico (RCE).
 - 2) Recuento Microscópico Directo (RMD).
- b) Establecer la variación de dicho parámetro desde el momento del parto hasta siete días de transcurrida la lactancia.
- c) Determinar la tendencia y magnitud de dichas variaciones y comprobar si existen diferencias significativas entre los diferentes días.
- d) Establecer la correlación entre los dos métodos.

El desarrollo de dichos objetivos proporcionará antecedentes acerca de la variación de la composición celular del calostro durante los primeros días de lactancia y como varían estas características a medida que transcurren los días post-parto. Obteniendo estos antecedentes se ayudará en la caracterización higiénica del calostro y en lo que se refiere a calificar si es factible su incorporación a la leche sólo por una evaluación sensorial.

² Proyecto FONDECYT 1961046.

4. MATERIAL Y METODOS

4.1. MATERIAL

Para el presente estudio se recolectaron 70 muestras cal ostrales de 10 vacas Holando-frisonas sin alteraciones clínicas evidentes de la glándula mamaria, pertenecientes al predio Vista Alegre de la Universidad Austral de Chile, ubicado en la Décima región, Provincia de Valdivia. El muestreo fue realizado entre Junio y Agosto de 1996.

4.1.1.- Recuento Microscópico Directo (RJVID).

- _ Microscopio ocular con objetivo de inmersión (factor microscópico de 402.761).
- _ Aceite de inmersión.
- _ Pipetas de 0,01 ml.
- _ Aguja roma.
- _ Guía de cuadrados.
- _ Estufa temperada a 40°C.
- _ Baño maría regulado a 40°C.
- _ Vasos de lavado.
- _ Vaso Coplin.
- _ Colorante de Neuman- Lampert (54ml de alcohol 96% + 1,12g de azul de metileno + 40ml de tetracloroetano + 4ml ácido acético glacial).

4.1.2.- Recuento Celular electrónico (RCE).

- _ Contador electrónico de partículas Coulter counter modelo Z_{BI} calibrado para partículas entre un diámetro entre 4,5 a 5 micrones.
- _ Baño de agua regulado a 80±1°C.
- _ Baño de agua regulado a 60±1°C.
- _ Solución fijadora (0,02g eosina + 10ml formaldehido + agua destilada c.s.p. 100 ml).
- _ Solución electrolítica (12,5ml etanol 96% + 2ml tritón x 100+ 84, 5ml solución de NaCl 0,9%+ 1 ml formalina 35% p.a.).
- _ Pipetas de 10 ml y 1 ml.
- _ Agitador eléctrico.

4.2. METODOS

4.2.1. Toma de muestras.

La primera muestra de cada vaca fue obtenida entre 2 a 18 horas después del parto y desde ahí sucesivamente cada 24 horas hasta concluir los 7 días post-parto.

Para la obtención de la muestra se desviaba el flujo de leche desde la unidad hacia un tarro lechero en donde se colectaba el producto completo de la ordeña. Desde aquí la secreción se trasvasijaba hacia un balde plástico previamente higienizado con agua caliente (70°C aproximadamente) y luego se homogeneizaba el calostro con un agitador metálico para obtener una muestra representativa de la ordeña. A partir de tal volumen, eran obtenidos cuidadosamente dos litros de calostro en botellas de vidrio esterilizadas y rotuladas.

Las muestras fueron llevadas al Laboratorio de Microbiología del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Universidad Austral de Chile, Valdivia, para su posterior análisis.

4.2.2. Procesamiento de las muestras.

Desde una de las botellas señaladas se tomó una submuestra de aproximadamente 100ml en un envase de vidrio estéril, previa homogeneización y en un ambiente estéril (cámara de flujo laminar o mechero) para evitar la contaminación bacteriana.

Posteriormente, de la submuestra se obtuvo una alícuota de 10ml para realizar el Recuento Celular Electrónico a la cual se agregaba 3 gotas de solución fijadora. Esta muestra era mezclada con un agitador electrónico y se llevaba a un calentamiento a baño maría siendo mantenida a 60°C por 30 minutos y posteriormente durante 10 minutos a 80°C en baño maría, para producir la dilución de los glóbulos de grasa.

Para el Recuento Microscópico Directo se elevaba primeramente la temperatura de la submuestra a 40°C, para luego disminuirla a 20°C, momento en que se volvía a homogeneizar para tomar 0,01 ml de muestra que se depositaba sobre una guía de cuadrados en el portaobjetos para realizar el frotis. Posteriormente se dejaba secar en una estufa a 40°C por 15 minutos para enseguida realizar la tinción de Neuman-Lampert dejándola secar a temperatura ambiente.

En cuanto al RMD, fue realizado fundamentándose en el método de Prescott y Breed modificado por Brazis (1970). La forma de lectura de la muestra y los análisis realizados, tanto para el Método Electrónico como para el Método Microscópico, se basaron en el Manual de Microbiología de Magariños (1978) que están acorde tanto con las normas nacionales (NCh1746, 1979a y NCh1763, 1979b) como con las internacionales.

4.2.3. Procesamiento de los datos.

Los datos obtenidos de los análisis descritos anteriormente, se procesaron en la base de datos computacional Microsoft Excel 7.0 para Windows 95.

4.2.4. Análisis estadístico.

Se realizaron análisis de varianza no paramétricos (Kruskal Wallis) según los resultados del Prueba de normalidad (Smirnov Kolmogorov) y la Prueba de homogeneidad de varianza (Levene). Para establecer diferencias significativas entre días, se realizó la prueba de Dunn's. Además se efectuaron pruebas de correlación para el total de los datos obtenidos, comparando los diferentes métodos, utilizando los programas computacionales Statistica versión 4.2 para Windows y Graph Pad Prism versión 2.00 para Windows. Se consideró un nivel de confianza de 5%.

5. RESULTADOS

5.1. Recuento Microscópico Directo.

Las medianas/día para los recuentos de células somáticas mediante el RMD fluctuaron entre $5,7 \times 10^5$ y $4,7 \times 10^4$ (tabla 1) con una desviación estándar para el total de datos de 849×10^3 (anexo 2).

Tabla 1: Valores mínimo, máximo, mediana, promedio y desviación estándar (en miles de células/ml) para los recuentos de células somáticas según el Método de Recuento Microscópico directo (RMD), en muestras calostrales de los primeros siete días post-parto.

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
Mínimo	6,7	144,1	39,3	13,4	9,1	1,5	10,4
Máximo	634,5	5.647,6	1.742,9	409,2	780,0	1.166,4	658,2
Mediana	204,2	572,2	179,1	126,5	89,4	60,5	47,2
Promedio	257,2	1.337,3	490,0	142,1	166,7	168,0	110,8
Des. Est.	251,8	1.899,8	576,8	113,7	229,4	353,6	195,5

En el gráfico 1 se pueden observar las tendencias de las medianas diarias determinadas para el Recuento Microscópico Directo.

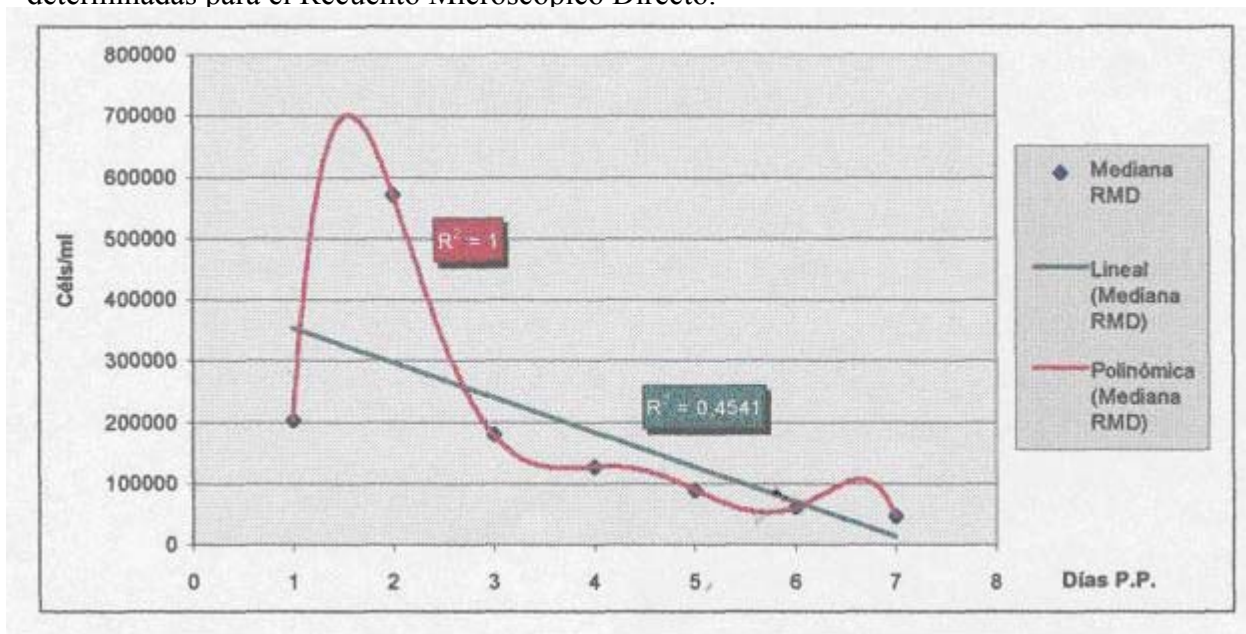


Gráfico 1. Tendencias lineal, polinómica y regresión para las medianas diarias obtenidas mediante el RMD para la secreción calostrales en los primeros 7 días post-parto.

5.2. Recuento Celular Electrónico.

Las medianas por día de células somáticas para el Recuento Celular Electrónico fluctuaron entre $1,3 \times 10^3$ y $4,3 \times 10^6$ céls/ml (tabla 2), con una desviación estándar para el total de datos de 7.559×10^3 (anexo 2).

Tabla 2: Valores mínimo, máximo, mediana, promedio y desviación estándar (en miles de células/ml) obtenidos por el método de Recuento Celular Electrónico (RCE), para muestras calostrales en los primeros siete días post-parto.

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
Mínimo	742,3	340,0	150,9	107,3	58,3	104,5	94,7
Máximo	54.600,0	5.590,0	1.780,6	853,4	853,7	1.452,3	866,6
Mediana	4.383,7	1.288,5	520,8	330,8	207,4	206,6	135,0
Promedio	12.949,7	1.874,5	708,3	412,7	304,9	325,8	233,1
Des. Est	16.971,6	1.746,6	555,4	262,8	237,0	402,1	236,7

En el gráfico 2 se muestran las tendencias para las medianas diarias de los recuentos de células somáticas mediante el método electrónico.

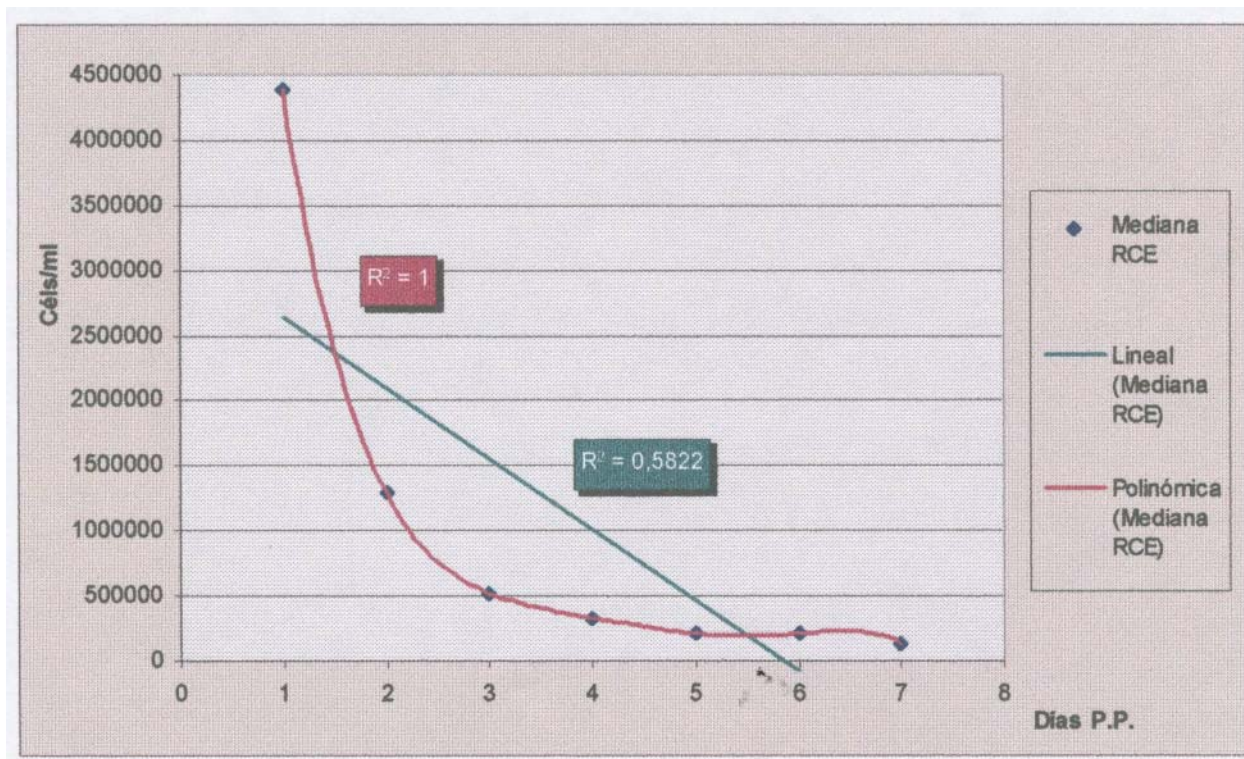


Gráfico 2. Líneas de tendencia polinómica y lineal para las medianas diarias obtenidas mediante Recuento Celular Electrónico en secreción calostrales de los primeros 7 días post-parto.

5.3. Comparación de valores entre ambos métodos.

Los valores promedio diarios obtenidos mediante dos métodos de recuento fluctuaron entre $1,3 \times 10^6$ y $1,1 \times 10^5$ céls/ml con una desviación estándar de 44.300 para el RMD, y entre $1,3 \times 10^7$ y $2,3 \times 10^5$ céls/ml con una desviación estándar de 4.686.400 para el RCE (tabla 3).

Tabla 3: Comparación de promedios diarios y desviaciones estándar para los promedios diarios (miles de células/ml), entre dos métodos de recuento de células somáticas.

	Promedios diarios RMD	Promedios diarios RCE
Día 1	257,2	12.949,7
Día 2	1.337,3	1.874,5
Día 3	490,0	708,3
Día 4	142,1	412,7
Día 5	166,8	304,9
Día 6	168,0	325,8
Día 7	110,8	233,1
Desv. Est.	44,3	4.686,4

En el gráfico 3 se puede apreciar la comparación entre las tendencias polinómicas para los valores promedio diarios de los métodos de recuento microscópico y electrónico de células somáticas.

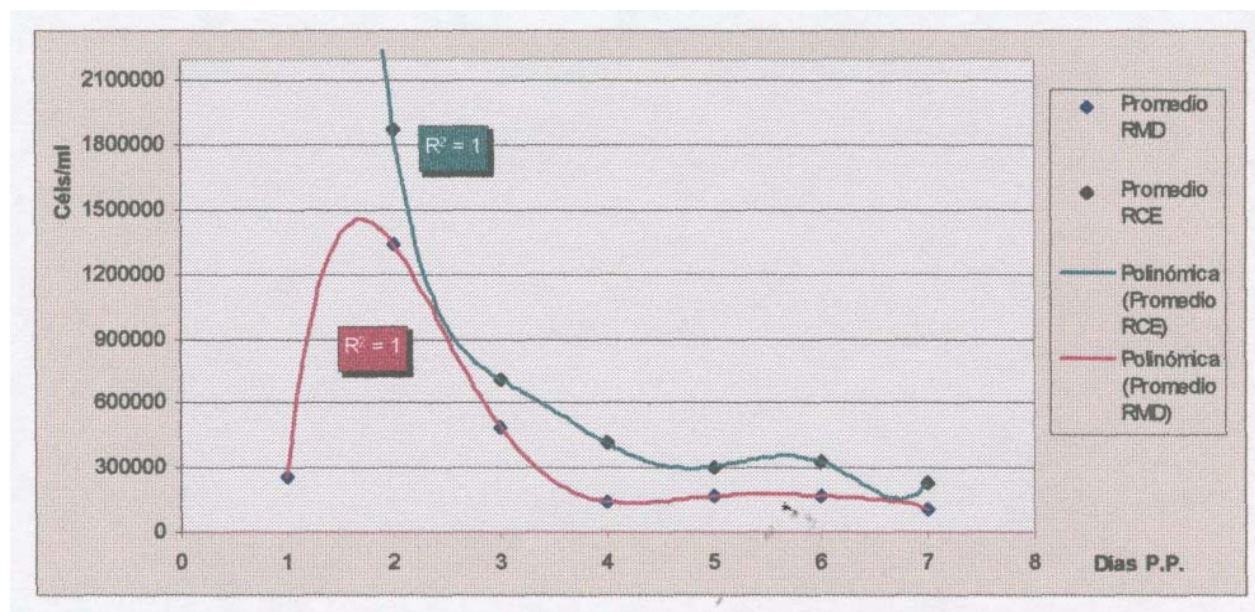


Gráfico 3. Tendencias polinómicas para los valores promedio diarios de recuentos células somáticas mediante los métodos electrónico y microscópico en muestras calostrales a partir del primer día hasta el séptimo día post-parto.

5.4. Análisis de varianza.

Para el RMD se determinaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el día dos y los días seis y siete post-parto (Análisis de varianza no paramétrico, anexo 5).

Para el RCE se determinaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el primer día y los días cuatro, cinco, seis y siete post-parto, y entre el día dos con los días cinco, seis y siete post-parto (Análisis de varianza no paramétrico, anexo 6).

5.5. Correlaciones

El coeficiente de correlación obtenido entre el método electrónico y el Recuento Microscópico Directo se muestra en la tabla 4.

Tabla 4: Coeficiente de correlación entre los dos métodos de recuento celulares, para el total de datos analizados ($n=70$).

	RMD	RCE
RMD	1,00	0,05
RCE	0,05	1,00

* Indica coeficientes de correlación significativos ($p < 0,05$).

6. DISCUSION

6.1.1. Aspectos generales de las vacas estudiadas.

Es importante considerar que ninguna de las vacas utilizadas en el presente estudio era de primer parto, por lo que todas estaban susceptibles de haber tenido algún grado de infección contraída en el período seco y arrastrada hasta el período calostrado. Además manifestaron amplia variabilidad para factores tales como edad, número de parto y antecedentes mastíticos (anexo 3). Respecto al promedio total de células somáticas obtenido por vaca en el transcurso del lapso muestreado (anexo 4), no necesariamente corresponde a lo mencionado por Schalm y Lasmanis (1968) y Jones y col. (1984) que señalan que con respecto a la edad de la vaca, en el transcurso de sus lactancias va aumentando el número de células somáticas, ya que se concentran en un volumen menor de leche producida.

No obstante Harmon (1994), menciona que la inflamación de la glándula mamaria que resulta de la introducción y multiplicación de microorganismos patógenos, es una compleja serie de eventos que principalmente llevan a cambios composicionales, reducción de la capacidad de síntesis y elevado recuento de células somáticas.

Además, el mismo autor señala que el factor más importante que afecta el recuento de células somáticas es el estado de infección de la glándula mamaria y los efectos que ocasionan la etapa de lactancia, edad y época del año en las variaciones de los recuentos celulares, son menores si la glándula no está infectada, situación que no fue considerada en el presente estudio.

6.1.2. Tendencias y análisis de varianza para los recuentos de células somáticas.

Las amplias desviaciones estándar encontradas en el presente trabajo (tablas 1, 2 y 3, anexo 3), en parte, pudieran ser explicadas dada la gran cantidad de factores que influyen sobre la variación de las células somáticas tanto dentro del cuarto y en la vaca como en el rebaño mismo. Entre estos se destacan el estado de infección del rebaño, la edad de la vaca, la etapa de lactancia, la estación del año, el parto, la variación dentro del día y entre los días, la raza, el stress, los aspectos técnicos y el manejo (Dohoo y Meek, 1982; Schukken y col., 1990; Francis, 1993).

Sin embargo, encontrar elevadas desviaciones estándares es común en trabajos de esta naturaleza, es así como Vial (1975), al trabajar con 480 muestras de leche, obtiene un promedio de 1.663.192 céls/ml y una desviación estándar de 3.352.625 céls/ml, Bodoh y col., (1975) en 13.733 recuentos obtiene un promedio de 692.000 céls/ml y una desviación estándar de 1.210.00 céls/ml, y González (1978) obtuvo una desviación estándar de 1.393.204 céls/ml para el RMD y otra de 1.167.233 céls/ml para el método electrónico en el rango de 800.000 a 5.000.000 céls/ml.

Dados estos motivos y debido a la distribución de los datos del presente trabajo, fueron utilizados para el procesamiento de los resultados, análisis de varianza no paramétricos, los cuales trabajan con medianas; la Prueba de Kruskal-Wallis para determinar la existencia de diferencias significativas entre los días y la Prueba de Dunn's para determinar entre cuales días.

De esta manera en el gráfico 1 y tabla 1 se puede observar una considerable alza en el número de células somáticas al segundo día de muestreo en comparación al día del parto, detectada por el Recuento Microscópico Directo (RMD), la que no es manifestada por el Recuento Celular Electrónico (RCE, gráfico 2 y tabla 2).

Este aumento de los recuentos celulares posterior al primer día post-parto ya ha sido mencionado por otros autores, Me Donald y Anderson (198Ib), al realizar un estudio en tres vacas, midiendo recuentos celulares mediante el método electrónico utilizando un contador de partículas Coulter counter modelo B, encontraron un moderado aumento en el recuento total de células somáticas de aproximadamente 500.000 céls/ml en los dos días siguientes al parto al compararlos con el día del parto. Este incremento en las células somáticas, luego del parto, fue justificado debido a una probable irritación posterior a la ordeña mecánica, lo que podría también ser aplicado al presente estudio.

El hecho que para los datos analizados el RCE no manifestara el incremento en el recuento celular al segundo día de muestreo que detecta el RMD (gráfico 3 y tabla 3), podría estar influenciado por la calibración del contador de partículas (Coulter counter).

En relación a lo anterior, para el estudio realizado por Mc Donald y Anderson (198Ib), la calibración del Coulter counter se ubicó por sobre los 6,3 micrones, y para el presente trabajo la calibración estaba determinada según la norma chilena (NCh1763, 1979b) para detectar partículas sobre los 4,5 micrones. Esto hubiera podido causar que para las muestras analizadas, el instrumento además de células detectara coágulos de proteínas (inmunoglobulinas, caseína y otras), provocados por los calentamientos previos a que se someten las muestras para el método electrónico, que como menciona FAO (1981), puede ocurrir con las proteínas del calostro al ser sometido a tratamientos térmicos. Al respecto, Zeidler y col. (1968) recomiendan que la leche para el Recuento Celular Electrónico (RCE), debe ser tomada de la primera leche del ordeño, no debiendo ser leche calostrual ni contener más de 5.000.000 de gérmenes por ml.

A pesar que el análisis de varianza efectuado para los datos obtenidos mediante el Recuento Microscópico Directo (anexo 5), determinara diferencias significativas en el número de células somáticas sólo en los días seis y siete post-parto comparados con el segundo día post-parto, y que el análisis de varianza para el Recuento Celular Electrónico (anexo 6), detectara diferencias significativas, sólo entre el primer día post-parto, y los días cuarto, quinto, sexto y séptimo post-parto, y entre el día dos, con los días cinco, seis y siete post-parto, las tendencias lineales son descendentes, tanto para el Recuento Microscópico Directo como para el Recuento Celular Electrónico (gráficos 1 y 2), lo que se puede expresar como una mejora en el contenido celular a medida que avanza la lactancia, es decir, su número decrece con el tiempo.

Al respecto, Jensen y Eberhart (1981) y Mc Donald y Anderson (1981-b), acorde con los resultados obtenidos, también mencionan una disminución en el contenido celular del calostro, a partir del primer día post-parto y tercer día post-parto respectivamente. Los mismos autores coinciden en atribuir que la subsecuente disminución en las células del calostro, resulta de los efectos combinados de la periódica ordeña y del aumento del volumen secretorio.

Asimismo en estudios anteriores, White y Rattray (1965) y Cullen (1966) mencionan la existencia de una relación entre el Recuento Celular Electrónico y los cambios cíclicos de presión en el alvéolo mamario, de tal manera que en la medida que aumenta la leche secretada por la glándula mamaria y por ende la presión intramamaria, el pasaje de células somáticas a la leche sería menor, lo que podría ser aplicado a la descarga producida en la primera ordeña y a la menor presión intramamaria en los posteriores días de ordeño. Además, Moraga y col. (1974), asocian a esto un efecto de dilución del contenido celular producto del mayor volumen de leche almacenada en la glándula.

En relación a lo anterior, Schalm y Lasmanis (1968), observaron un aumento en la cantidad de células somáticas en la última porción de la leche ordeñada, posiblemente debido a la caída de presión ejercida sobre los alvéolos durante el ordeño, lo que provocaría una descarga mayor de células junto a otros componentes como ocurre con la grasa de la leche, factor que estaría siendo eliminado en el presente trabajo al tomar la muestra del producto completo de la ordeña.

Además, en las tablas 1 y 2 se puede apreciar que a partir del cuarto día post-parto las desviaciones estándares se hacen notablemente más pequeñas para ambos métodos, lo que podría significar una estabilización de las secreciones mamarias en las diferentes vacas, en lo referente a los recuentos celulares para los métodos utilizados, a medida que transcurre la lactancia.

6.1.2. Correlaciones.

La correlación obtenida para el total de muestras entre los dos métodos de recuento de células somáticas fue de 0,05 (tabla 4), la cual es sumamente baja comparada a lo que se menciona para el caso de la leche. Por ejemplo, Thompson y col. (1966) establecieron un coeficiente de correlación de 0,95, Pearson y col. (1970) uno de 0,96. Para Chile, RÍOS (1985) señala uno de 0,92 y otro de 0,97 para el caso de leches refrigeradas y no refrigeradas respectivamente, y González (1978) uno de 0,88.

Es importante tomar en cuenta que todo método está sometido a variaciones, a lo que no hacen excepción el Recuento Microscópico Directo ni el Recuento Celular Electrónico. Es así como Leidl y col., (1961) indican como factores que influyen en el RMD los siguientes: la experiencia del operador con el método, la calidad del frotis y la cantidad de frotis que cuenta.

Por los factores nombrados, estos autores señalan que el recuento puede tener un error de hasta un 45% con un promedio de 15% para leches que contienen menos de 300.000 céls/ml., y en leches que tienen una gran concentración celular el recuento se haría casi irrealizable y los valores obtenidos representarían sólo una aproximación. Además Kleinschroth y col. (1968), señalan que un 0,3% a un 0,5% de los recuentos son falseados en sus resultados por el contenido bacteriano y de materia grasa demasiado altos.

Por otra parte Grootenhuis (1975) señala que entre los factores que mayormente causan error en el recuento celular electrónico están la dilución de las muestras, la calibración del contador electrónico, la homogeneización de la muestra y los disturbios electromagnéticos en el aparato.

No obstante, al eliminar los datos correspondientes al primer día de muestreo, la correlación aumenta significativamente a 0,95 (Anexo 7). Esto equivale a señalar que para los resultados obtenidos en el presente trabajo y mediante los métodos utilizados en las muestras calostrales a partir del segundo día post-parto, tienen una elevada correlación, lo que si es comparable con los coeficientes de correlación mencionados anteriormente para el caso de la leche.

6.5. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en las condiciones del presente trabajo se puede concluir que:

- 1.- La correlación entre los métodos de Recuento Microscópico Directo y Recuento Celular Electrónico no es estadísticamente significativa, para las muestras calostrales del presente estudio al considerar todos los días estudiados; pero al eliminar los datos correspondientes al primer día post-parto, la correlación aumenta significativamente ($r = 0,95$, $p < 0,05$).
- 2.- Existe un considerable aumento en los recuentos de células somáticas correspondientes al segundo día posterior al parto en comparación al día del parto, detectado por el método de Recuento Microscópico Directo, el que se produce probablemente por un efecto irritante causado por el ordeño mecánico.
- 3.- Existe un elevado recuento celular en el primer día post-parto detectado por el Método de Recuento Electrónico de Partículas, el que posiblemente sería provocado por coágulos de proteínas producidos en los calentamientos de las muestras previos al análisis.
- 4.- Los valores obtenidos para los dos métodos de recuento de células somáticas tienen una significativamente clara tendencia a la disminución a medida que avanza la lactancia, desde el segundo día hasta el sexto y séptimo día post-parto, lo que lleva a concluir que la composición celular del calostro para las muestras del presente estudio y de acuerdo a los métodos utilizados, disminuye notablemente a partir del 2^{do} día de lactancia, para ir estabilizándose gradualmente en los posteriores días.

7. BIBLIOGRAFIA

- AGROANALISIS. 1997. Análisis coyuntural. Mercado Mundial. Mayo, 1997. 153: 5-6.
- BODOH, G.W., W.T. BATTISTA, L.H. SCHULTZ. 1975. Variation in the somatic cell counts in dairy herds improment samples. J. Dairy Sci. 58: 753.
- BRAZIS, A.R. 1970. Direct Microscope Leucocyte count test, screening and confirmatory test for the determination of anormal milk. Departament of Health, Education and Welfare. Ohio, U.S.A.
- BURVENICH, C, A.J. GUIDRY, M.J. PAAPE. 1995. Natural defence mechamsm of the lactating and dry mammary gland. Proceedings of the Third IDF International Mastitis Seminar. Tel-Aviv, Israel, 28 May-1 June 1995.
- BUTLER, J.E. 1973. The occurrence of immunoglobulins fragments, two types of lactoferrin and a lactoferrin IgG2 complex in bovine colostral and milk way. Bioch. Bioph. 295: 134.
- CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN. 1979a. Leche cruda. Determinación de células somáticas. Método recuento microscópico directo, Norma Chilena 1746.
- CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN. 1979b. Leche cruda. Determinación de células somáticas. Método Electrónico. Norma Chilena 1763.
- CHILE, MINISTERIO DE AGRICULTURA. 1978. Fija sistema de control y clasificación de leche según calidad. Decreto Supremo N° 271 del 28 de agosto de 1978.
- CHILE, MINISTERIO DE AGRICULTURA. 1979. Reglamento específico para la determinación de calidad de leche cruda. Decreto Supremo N° 178 del 5 de junio de 1979.
- CARLSON, G.P., J.J. KANEKO. 1975. Intravascular granulocyte kinetics in developing calves. Am. J. Vet. Res. 37: 421.
- CONCHA, C. 1986. Studies on cellular defence mechanisms in the bovine mammary gland. Degree thesis for M.V. Swedish University of Agricultural Sciences and National Veterinary Institute. Uppsala, Sweden.

- CONCHA, C, O. HOLMBERG, B. MOREIN. 1980. Characterization and response to mitogens of mammary lymphocytes from the bovine dry-period secretion. J. Dairy Res. 47:305.
- CULLEN, G. A. 1966. Cells in milk. Vet. Bull. 36: 337- 346.
- DOHOO, I.R., A.H. MEEK. 1982. Somatic cell counts in bovine milk. Can. Vet. J. 23: 119-125.
- FAO, ORGANIZACION DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACION. 1981. Manual de composición y propiedades de la leche, Equipo Regional de Fomento y Capacitación en Lechería para América Latina. Santiago. Chile.
- FAO, ORGANIZACION DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACION. 1984. Estudio producción y sanidad animal. Los sabores anormales en la leche fresca. Roma, 1983.
- FRANCIS, P. 1993. Update origins, interpretations and uses of high milk somatic cell counts. In Practice. 15:288-290.
- FRANDSON, R.D. 1992. Anatomía y fisiología de los animales domésticos. 5ta Ed., Edit. Interamericana. México.
- GONZÁLEZ, V.B. 1978. Comparación de los métodos de Recuento Microscópico Directo y Recuento Electrónico de Partículas en Suspensión para la determinación de células somáticas en leche fresca. Tesis M.V. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias. Valdivia, Chile.
- GROOTENHUIS, G 1975. Somatic cells counting in the Netherlands. Proceedings of Seminary on mastitis control. 85: 166-124.
- HARMON, R. J. 1994. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. J. Dairy Sci. 77:2108-2110.
- HARTMAN, P.E, 1973. Changes in the composition and yield of mammary secretion of cows during the initiation of lactation. J. Endocr. 59: 231-247.
- HILLERTON, J.E, C.H. KNIGHT, A. TURVEY, S.D. WHEATLEY, S.J. WILDE. 1990. Milk yield and mammary function in dairy cows milked four times daily. J. DairyRes. 57: 285.
- JAIN, N.C. 1986. Haematology of cattle. In: Schalm's Veterinary Haematology. 4^{ta} ed. Lea and Febiger, Philadelphia.

- JENSEN, D.L., R.J. EBERHART. 1981. Total and differential cell counts in secretions of the nonlactating bovine mammary gland. Am. J. Vet. Res. 42: 743-747.
- JONES, G.M., R.E. PEARSON, G.A. CLABAUGH, C.W. HEALD. 1984. Relationship between somatic cell counts and milk production, J. Dairy Sci. 67: 1823-1831.
- KLEINSCHROTH, E., O. RICHTER, H. SCHUMANN. 1968. Die Anwendund der electronischen Bestimmung des Milchzellgehaltes im Eutergesundheitsdienst und in der Qualitätsüberwachung der Milch. Tierarztl. Umsch. 4: 1-19.22222
- LEE, C.S., F.B.P. WOODING, P. KEMP. 1980. Identification, properties, and differential counts of cell populations using electrón microscopy of dry cow secretions, colostrum and milk from normal cows. J. Dairy Res.47: 39-50.
- LEIDL, W., O.W. SCHALM, P. LUPS. 1961. Die Zellzahlbestimmung in der milch nach Prescott undBreed und ihre Fehlermöglichkeiten. Milchwissenschaft. 16: 557-567.
- LERCHE, M. 1969. Inspección veterinaria de la leche. Edit. Acribia, Zaragoza. España.
- MAGARIÑOS, H. 1978. Manual Practico. Análisis Microbiológico de Leche y Productos Lácteos. Edit. Universidad Austral de Chile. Valdivia. Chile.
- Mc DONALD, J.S., A.J. ANDERSON. 1981a. Total and differential somatic cell counts in secretions from non-infected bovine mammary glands. The early nonlactating period. Am. J. Vet. Res. 42: 1360-1365.
- Mc DONALD, J.S., A.J. ANDERSON. 1981b. Total and differential somatic cell counts in secretions from non-infected bovine mammary glands. The peripartum period. Am. J. Vet. Res. 42: 1366-1368.
- MILLER, R.H., M.J. PAAPE, R.R. PETERS, M.D. YOUNG. 1990. Total and differential somatic cell count and N-Acetyl-p-D-Glucosaminidase activity in mammary secretions during dry period. J. Dairy Sci. 73: 1.751.
- MILLER, R.H., M.J. PAAPE, LA. FULTON. 1991. Variation in milk somatic cells of heifers at first calving. J. Dairy Sci. 74: 3782.
- MILLER, R.H., M.J. PAAPE, L.A. FULTON, M.M. SCHUTZ. 1993. The relationship of milk somatic cell count to milk yields for holstein heifers after first calving. J. Dairy Sci. 76: 728.
- MORAGA, L, L. ZURITA, M. RIVAS, I. PALAVICINO, K. RUSCH. 1974. Contribución al estudio de la mastitis del caprino. Rev. Soc. Med. Vet. Chile. 24: 5-10.

- OLIVER, S.P., B.A. MITCHELL. 1983. Susceptibility of bovine mammary gland to infection during the dry period. J. Dairy Sci. 66: 1162.
- PAAPE, M.J., W.P. WERGIN. 1977. The leukocyte as a defense mechanism. J. Am. Vet. Med. Ass. 36: 337.
- PAAPE, M.J., A.V. CAPUCO, A. LEFCOURT, C. BURVENICH, R.H. MILLER. 1992a. Prospects for automatic milking. Pudoc Scientific Publishers. November, 23-25. Wageningen, Netherlands.
- PAAPE, M.J., R.H. MILLER, M.D. YOUNG, R.R. PETERS. 1992b. Influence of involution on intrammary phagocytic defense mechanisms. J. Dairy Sci. 75: 1849.
- PEARSON, J., C. WRIGTH, D. GREED. 1970. A study of methods for estimating the cell content of bulk milk. J. Dairy Res. 37: 467-479.
- REECE, W. 1991. Physiology of domestic animals. Lea and Febiger, Philadelphia.
- RIOS, R. 1985. Estimación de células somáticas en leche utilizando tres métodos de recuento. Tesis, LA., Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias, Valdivia, Chile.
- ROBINSON, R.K. 1981. The microbiology of raw milk. Dairy Microbiology. Vol 1.
- ROSELL, J., I. DOS SANTOS. 1952. Métodos analíticos de Laboratorio Lactológico. Edit. Labor, Barcelona. España.
- SAVILL, J., V. FADOK, P. HENSON, C. HASLETT. 1993. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. Inmunol. Today. 14: 131.
- SCHALM, O.W., J. LASMANIS. 1968. The leukocytes: origin and function in mastitis. J. Am. Vet. Med. Ass. 153: 1688-1694.
- SCHALM, O.W., J. LASMANIS, N.C. JAIN. 1976. Conversión of chronic Staphylococcal mastitis to acute gangrenous mastitis after neutropenia in blood and bone marrow produced by an equine anti-bovine leucocyte serum. Am. J. Vet. Res. 37: 885.
- SCHALM, O.W., E.J. CARROL, N.C. JAIN. 1971. Bovine Mastitis. Lea and Febiger, Philadelphia.
- SCHUKKEN, Y., J. BUURMAN, A. BRAND, D. VAN der GEER, F.J. GROMMERS. 1990. Population dynamics of bulk milk somatic cell counts. J. Dairy Sci. 73: 1343-1350.

- SHELDRAKE, R.F., R.J.T. HOARE, G.D. MCGREGOR. 1983. Lactation stage, parity, and infection affecting somatic cells, electrical conductivity and serum albumin in milk. J. Dairy Sci. 66: 542,
- SMITH, K.L., D.A. TODHUNTER. 1982. The physiology of mammary glands during the dry period and the relationship to infection. In: 21st Annual Meeting National Mastitis Council. Inc. Louisville, Kentucky, USA.
- SORDILLO, L.M., S.C. NICKERSON, R.M. AKERS, S.P. OLIVER. 1987. Secretion composition during bovine mammary involution and the relationship with mastitis. Int. J. Biochem. 19: 1165.
- TARGOWSKI, S.P., M. NIEMIALTOWSKI. 1986. Appearance of Fe receptors on polymorphonuclear leukocytes after migration and their role in phagocytosis. Infect. Immun. 52: 798.
- THOMPSON, D., H. PACKARD, R. GINN. 1966. Electronic somatic cell count-chemical-method DMSCC, WMT test for raw milk. J. Milk Food Tech. 39: 854-858.
- VIAL, F. 1975. Prospección del contenido de células somáticas en leche cruda recibida en plantas en la Provincia de Valdivia. Tesis M. V. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias. Valdivia, Chile.
- WATSON, D.L. 1980. Immunological functions of the mammary gland and its secretion. Comparative review. Aust. J. Biol. Sci. 33: 403-422.
- WHEELLOCK, J.V., A. SMITH, F.H. LISTER. 1967. Changes in the quantity and composition of mammary gland secretion in the dry period between lactations. The beginning of the dry period. J. Dairy. Res. 34: 1-12.
- WHITE, F., E.A. RATTRAY. 1965. Diurnal variation in the cell content of cow's milk. J. Comp. Path. 75: 253-261.
- ZEIDLER, M., A. TOLLE, W. HEESCHEN. 1968. Verbesserte Präparationstechnik zur elektronischen Bestimmung des Zellgehaltes in Milch. Milchwissenschaft. 23: 564-568.
- ZURITA, L. 1988a. Mastitis subclínica, grave problema económico en lecherías. Chile Agrícola. 13:326-328.
- ZURITA, L. 1988b. Mastitis Bovina, situación nacional. Patol. Anim. 2: 36-41.

8. ANEXOS

Anexo 1. Resultados de los recuentos de células somáticas por los métodos de Recuento Microscópico Directo (RMD) y Recuento Celular Electrónico (RCE) ordenados por vaca, día y horas post-parto.

DIA	HRS. P-P.	NOMBRE VACA	CEL. SOM. RMD	CEL.SOM. RCE.
1	16,50	DUPA	634486	4373600
2	40,50	DUPA	699833	1934216
3	64,50	DUPA	1742908	1780583
4	88,50	DUPA	13425	746600
5	1 12,50	DUPA	9112	320850
6	136,50	DUPA	4665	239850
7	160,50	DUPA	10403	292100
1	14,50	ENOJADA	22287	4393700
2	28,50	ENOJADA	266641	1928000
3	52,50	ENOJADA	77507	618500
4	76,50	ENOJADA	63002	228683
5	100,50	ENOJADA	43589	164200
6	124,50	ENOJADA	3122	224800
7	148,50	ENOJADA	12837	112300
1	16,00	FRAGA	265756	22690000
2	40,00	FRAGA	4008612	4359250
3	64,00	FRAGA	831423	1029800
4	88,00	FRAGA	409236	444300
5	112,00	FRAGA	222303	348600
6	136,00	FRAGA	48071	125483
7	160,00	FRAGA	47763	144250
1	6,00	JULIA	6657	22195000
2	30,00	JULIA	659181	1426250
3	54,00	JULIA	498726	867950
4	78,00	JULIA	218270	692250
5	102,00	JULIA	78993 1	853700
6	126,00	JULIA	1 166355	1452300
7	150,00	JULIA	658234	866550
1	15,50	KASPITA	142602	1950700
2	50,50	KASPITA	182647	647250
3	74,50	KASPITA	191192	423150
4	98,50	KASPITA	1 18273	230550
5	122,50	KASPITA	71258	206183
6	146,50	KASPITA	72251	219650
7	170,50	KASPITA	46652	96100

1	16,50	LINCA	391824	1615050
2	40,50	LINCA	144147	340016
3	64,50	LINCA	39347	194000
5	88,50	LINCA	199692	185850
6	112,50	LINCA	107244	193600
7	136,50	LINCA	69541	174666
4	160,50	LINCA	171189	162050
1	14,50	LINDAMA	436621	1692150
2	28,50	LINDAMA	485237	845250
3	52,50	LINDAMA	167036	226050
4	76,50	LINDAMA	71976	332100
5	100,50	LINDAMA	56638	146600
6	124,50	LINDAMA	48772	104500
7	148,50	LINDAMA	41522	104133
1	17,50	JALIL	626517	15244900
2	41,50	JALIL	5647555	5590000
3	65,50	JALIL	1147691	1410600
4	89,50	JALIL	134712	853400
5	113,50	JALIL	119869	556050
6	137,50	JALIL	111401	359950
7	161,50	JALIL	96847	320350
1	5,50	PEGASA	23733	54600000
2	18,50	PEGASA	1027530	1150700
3	42,50	PEGASA	164087	381650
4	66,50	PEGASA	173740	329550
5	90,50	PEGASA	107608	208550
6	114,50	PEGASA	116513	179150
7	138,50	PEGASA	113413	125800
8	162,50	PEGASA	125402	126950
1	14,50	REINITA	21040	742266
2	28,50	REINITA	251725	523600
3	52,50	REINITA	40415	150850
4	76,50	REINITA	46794	107283
5	100,50	REINITA	47383	58250
6	124,50	REINITA	1543	158400
7	148,50	REINITA	10885	94700

Anexo 2. Valores máximo, mínimo, promedio y desviación estándar por método para el total de datos (miles de células/ml).

	CEL.SOM. RMD	CEL.SOM. RCE
Máximo	5.647,6	54.600,0
Mínimo	1,5	58,3
Promedio	381,7	2.401,3
D. Estándar	849,0	7559,8

Anexo 3. Antecedentes generales de las vacas muestreadas.

VACA	FECHA NACIMIENTO	Nº PARTO	ANTECEDENTES MASTITIS
LINCA-0938	18-Abr-93	2do	Sin antecedentes
LINDAMA-1766	25-Jul-92	2do	Sin antecedentes
REINITA- 1722	15-Ago-91	3ro	Sin antecedentes
ENOJADA- 1744	17-Sep-91	3ro	Sin antecedentes
FRAGA-785	25-Mar-91	4to	Sin antecedentes
JALIL-1644	18-Jul-90	4to	Cuartos posteriores Subclínica (año 96)
JULIA-744	28-Abr-90	5to	Sin antecedentes
KASPITA-1612	06-Jul-89	6to	Subclínica (año 96)
DUPA-464	08-Jun-86	8vo	Al finalizar ordeñas (causa anatómica)
PEGASA-514	29-Abr-87	8vo	Cuarto P.D. Clínica (año 96)

Anexo 4. Promedios totales obtenidos por vaca (en miles de células/ml) para los dos métodos de recuento de células somáticas ordenados por Nº de parto.

VACA	Nº PARTO	CEL.SOM. RMD	CEL.SOM. RCE
LINCA	2do	160,4	409,3
LINDAMA	2do	186,8	492,7
REINITA	3ro	599,7	262,2
ENOJADA	3ro	69,9	1.095,7
FRAGA	4to	833,3	4.163,1
JALIL	4to	1.126,4	3.476,5
JULIA	5to	571,1	4.050,6
KASPITA	6to	117,8	539,1
DUPA	8vo	445,0	1.384,0
PEGASA	8vo	246,7	8.139,3

Anexo 5. Análisis de varianza no paramétrico para el método de Recuento Microscópico Directo. Test no paramétrico de Kruskal Wallis y comparativo de medianas (Test de Dunn's). Variable independiente día, dependiente RMD.

Parámetro	Valor		
Kruskal-Wallis test			
Valor P	0.0022		
Exactitud o aproximación del valor de P?	Aproximación Gaussiana		
Resumen del valor de P	**		
Varían las medianas significativamente ($P < 0.05$)	Sí		
Numero de grupos	7		
Kruskal-Wallis estadística	20.60		
Test de comparación múltiple	Diferencia en la suma de cuadrados	Valor P	Resumen
Día 1 vs Día 2	-21.80	$P > 0.05$	ns
Día 1 vs Día 3	-8.800	$P > 0.05$	ns
Día 1 vs Día 4	1.100	$P > 0.05$	ns
Día 1 vs Día 5	3.500	$P > 0.05$	ns
Día 1 vs Día 6	10.90	$P > 0.05$	ns
Día 1 vs Día 7	13.00	$P > 0.05$	ns
Día 2 vs Día 3	13.00	$P > 0.05$	ns
Día 2 vs Día 4	22.90	$P > 0.05$	ns
Día 2 vs Día 5	25.30	$P > 0.05$	ns
Día 2 vs Día 6	32.70	$P < 0.01$	**
Día 2 vs Día 7	34.80	$P < 0.01$	**
Día 3 vs Día 4	9.900	$P > 0.05$	ns
Día 3 vs Día 5	12.30	$P > 0.05$	ns
Día 3 vs Día 6	19.70	$P > 0.05$	ns
Día 3 vs Día 7	21.80	$P > 0.05$	ns
Día 4 vs Día 5	2.400	$P > 0.05$	ns
Día 4 vs Día 6	9.800	$P > 0.05$	ns
Día 4 vs Día 7	11.90	$P > 0.05$	ns
Día 5 vs Día 6	7.400	$P > 0.05$	ns
Día 5 vs Día 7	9.500	$P > 0.05$	ns
Día 6 vs Día 7	2.100	$P > 0.05$	ns

Anexo 6. Análisis *de* varianza no paramétrico para el método de Recuento Celular Electrónico. Test no paramétrico de Kruskal Wallis y comparativo de medianas (Test de Dunn's). Variable independiente día, dependiente RCE.

Parámetro	Valor		
Kruskal-Wallis test Valor de P	P < 0.0001		
Exactitud o aproximación del valor de P?	Aproximación Gaussiana		
Resumen del valor de P	***		
Varían las medianas significativamente (P < 0.05)	Sí		
Numero de grupos	7		
Kruskal-Wallis estadística	41.01		
Test de comparación múltiple	Diferencia en la suma de cuadrados	Valor P	Resumen
Día 1 vs Día 2	10.30	P > 0.05	ns
Día 1 vs Día 3	23.50	P > 0.05	ns
Día 1 vs Día 4	31.00	P < 0.05	*
Día 1 vs Día 5	38.10	P < 0.001	***
Día 1 vs Día 6	39.60	P < 0.001	***
Día 1 vs Día 7	46.50	P < 0.001	***
Día 2 vs Día 3	13.20	P > 0.05	ns
Día 2 vs Día 4	20.70	P > 0.05	ns
Día 2 vs Día 5	27.80	P < 0.05	*
Día 2 vs Día 6	29.30	P < 0.05	*
Día 2 vs Día 7	36.20	P < 0.01	**
Día 3 vs Día 4	7.500	P > 0.05	ns
Día 3 vs Día 5	14.60	P > 0.05	ns
Día 3 vs Día 6	16.10	P > 0.05	ns
Día 3 vs Día 7	23.00	P > 0.05	ns
Día 4 vs Día 5	7.100	P > 0.05	ns
Día 4 vs Día 6	8.600	P > 0.05	ns
Día 4 vs Día 7	15.50	P > 0.05	ns
Día 5 vs Día 6	1.500	P > 0.05	ns
Día 5 vs Día 7	8.400	P > 0.05	ns
Día 6 vs Día 7	6.900	P > 0.05	ns

Anexo 7. Coeficiente de correlación obtenido entre los dos métodos de recuento celulares en los datos obtenidos a partir del segundo día post-parto (n=60).

	RMD	RCE
RMD	1,00	*0,95
RCE	*0,95	1,00

* Indica coeficientes de correlación significativos ($p < 0,05$).

AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos a todos los que colaboraron en la realización de esta Tesis, en especial a:

_ Dr. Carlos Concha de la Universidad de Upssala, Suecia, por tener la paciencia de responder a mis consultas desde la distancia.

_ Sra. Sade Selaive y Sra. Mariela Horzella, por su apoyo y ayuda en la parte de laboratorio.

_ Dr. Kare Stange, por su ayuda en la parte escrita y computacional.

_ Mi familia, por su comprensión y paciencia.

_ Dios...