

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**CONTAJE DE CÉLULAS SOMÁTICAS EN LECHE OVINA: EFECTOS DE LA
FRECUENCIA DE ORDEÑE Y EDAD; RELACIÓN CON EL CALIFORNIA
MASTITIS TEST Y AGENTES ETIOLÓGICOS DE MASTITIS SUBCLÍNICA.**

“por”

Laura ACOSTA, Andrea GÓMEZ, Luciana MESA

**TESIS DE GRADO presentada como uno
de los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias
Orientación: Higiene, Inspección-
Control y Tecnología de los Alimentos
de origen animal. Producción Animal**

MODALIDAD: Ensayo experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2013**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

Dra. Stella Reginensi

Segundo miembro (Tutor):

Dr. Roberto Kremer

Tercer miembro:

Dra. Laura Sorondo

Cuarto miembro

Dra. Silvana Carro

Fecha:

28/08/2013

Autor:

Laura ACOSTA, Andrea GÓMEZ, Luciana MESA

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer al Dr. Roberto Kremer, tutor de esta tesis por la realización de este trabajo y por sus conocimientos compartidos y enseñados.

A la Dra. Silvana Carro, cotutora por su dedicación, apoyo y conocimientos brindados.

Al Departamento de Ciencia y Tecnología de la Leche de la Facultad de Veterinaria, Dr. Álvaro González, Dra. Lucia Grille, Lic. Sheila Giacaman, Dr. Daniel Cruz y Dr. Fernando Arnaud, por la ayuda y enseñanzas.

Al Campo Experimental N° 1 de Facultad de Veterinaria, Migues, por la buena disposición y colaboración.

Agradecemos a aquellas personas que nos ayudaron en la búsqueda bibliográfica en la Biblioteca de Facultad de Veterinaria.

A la Br. Victoria Rohrer, por su colaboración en la elaboración de la traducción del resumen.

A nuestras familias y amigos, por el apoyo y estar siempre presentes.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	5
RESUMEN	6
SUMMARY	7
INTRODUCCIÓN	8
REVISION BIBLIOGRAFICA	9
Características de la producción lechera ovina	9
Determinación de cantidad de células en leche ovina	12
Relación RCS y etapa de lactancia	14
Relación RCS y frecuencia de ordeño.....	14
Número de lactancia, edad del animal y el nivel productivo	15
Recuento de células somáticas, CMT y mastitis	15
Relación de agentes etiológicos con CMT y RCS	16
OBJETIVOS	18
Objetivo general	18
Objetivos específicos.....	18
HIPÓTESIS	18
MATERIALES Y MÉTODOS	18
General.....	18
Grupos experimentales.....	19
Métodos.....	19
CMT y extracción de muestras para recuento celular y cultivo.....	19
Procedimiento de muestro.....	19
California Mastitis Test.....	20
Recuento de células somáticas	20
Aislamiento e identificación de microorganismos	20
Análisis estadísticos	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
CONCLUSIONES	29
BIBLIOGRAFÍA	31

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Tabla I: Características generales de la leche ovina y bovina	10
Tabla II: Media y desvío estándar de producción de leche (litros) corregido a los 100 días de ordeño según frecuencia de ordeño diaria y edad	23
Tabla III: Composición de leche de muestras de tanque tomadas en distintos días de ordeño.....	24
Tabla IV: Medias y desvío estándar del recuento celular (miles de células/ml y logaritmos en base 10) a lo largo del periodo de ordeño, con un régimen de 1 o 2 ordeños diarios, en borregas y ovejas	25
Tabla V: Logaritmos y RCS (10^3 cel/ml), medias y desvío estándar de recuento Celular al inicio y fin del periodo de ordeño según edad y frecuencia de ordeño	26
Tabla VI: Medias y desvío estándar de RCS y logaritmo en base 10 según grados de CMT	27
Tabla VII: Microorganismos aislados de muestras individuales con mayor grado de CMT	27
Tabla VII: Microorganismos aislados según muestras sembradas al inicio y fin del período de ordeño	28

RESUMEN

En nuestro país la lechería ovina es una actividad no consolidada, que se introdujo en busca de una nueva alternativa para pequeños y medianos productores con poca capacidad de inversión.

En los últimos años ha habido un esfuerzo en los países industrializados para aplicar planes de pago para leche de cabra y oveja basada en el recuento de células somáticas (RCS) y el contenido de proteínas, similares a los observados para la leche bovina. En busca de una caracterización de la leche ovina, el presente trabajo tiene el objetivo de determinar la cantidad de células somáticas en leche ovina, la variación individual a lo largo del período de ordeño y con distintos regímenes de ordeño y su relación con California Mastitis Test (CMT) y aislar e identificar microorganismos de muestras de leche con mayor grado de CMT. Los ensayos se realizaron en 70 ovejas Milchschaef que integran un sistema lechero en el Campo Experimental N°1 de la Facultad de Veterinaria (Migues).

Se conformaron dos grupos con distintas rutinas de ordeño de uno y dos ordeños diarios. Durante el período que va desde el último tercio de gestación hasta el secado de la oveja, la alimentación se realizó en base a un pastoreo rotativo sobre praderas sembradas. Se realizó el control lechero, donde el primer control se llevó a cabo en un máximo de 52 días postparto con no más de 35 días de ordeño, los siguientes controles se hicieron cada 30 días como máximo. Se analizó la producción mínima diaria (200ml) y composición de leche de cada animal, en total se realizaron 5 controles lecheros en todo el periodo de ordeño de las ovejas. Para análisis de CMT, RCS y cultivo bacteriológico se tomaron las muestras de las ovejas al principio del periodo ordeño (setiembre) y fin del periodo de ordeño (diciembre) de forma manual antes del ordeño mecánico.

Los agentes etiológicos aislados con mayor frecuencia fueron *Staphylococcus coagulasa positiva*, *Staphylococcus coagulasa negativa* y *Enterococcus spp*, luego le sigue *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*, en menor frecuencia.

En cuanto al RCS existen variaciones a lo largo del periodo de ordeño, donde el mayor conteo se observó al inicio (259.000 células/ml). Según la edad de las ovejas, las adultas presentaron un mayor RCS al compararlas con borregas.

Al analizar la frecuencia de ordeño se observa un mayor RCS en ovinos ordeñados dos veces al día.

Se concluye que como método de diagnóstico para mastitis subclínica el CMT en ovinos no es confiable, presentando baja sensibilidad.

SUMMARY

In our country dairy sheep is a new entrenched activity. Introduced looking for a new alternative to small and medium producers with limited investment capacity. In the last few years there has been an effort in industrialized countries to implement payment plans for goat and sheep milk based on somatic cell count (SCC);, and protein count, similar to those observed for bovine milk. The current study aims to determine somatic cells number in sheep's milk; individual variation throughout the milking period and with different milking regimens and its relation with California Mastitis Test (CMT) and isolate and identify microorganisms in milk samples with higher degree of CMT sheep milk's characterization trying to find sheep's milk characterization.

We conducted the experiments in 70 Milchschaaf sheep part of dairy system located in Migue's Veterinary School Experimental Station N° 1. We formed two groups of ewes submitted to different milking routines milked once and twice daily.

During the period between the last third of gestation until the end of lactation, feeding was based on rotational grazing on cultivated pastures. Dairy control was performed, where the first one was carried out at a maximum of 52 postpartum days, with no more than 35 days of milking, the following controls were made within a maximum 30 days. Minimum daily production and, milk composition of each animal was analyzed, a total of five milk control were conducted throughout sheep lactation period. We took manual samples before mechanic milking from the ewes for CMT, SCC and bacteriological culture at the beginning of lactation (September) and at the end of lactation (December).

The etiological agent most frequently isolated were coagulase positive *Staphylococcus* and cuagulase negative *Staphylococcus*, then followed by *Streptococcus agalactiae* and *Escherichia coli*.

Regarding SCC there are variations throughout lactation, the major count was observed at the beginning (259.000 cells/ml). According to the sheep's age, adults showed a major SCC compared to lambs.

By analyzing milking frequency we observed greater SCC in sheep milked twice daily.

We conclude that CMT is unreliable and has low sensitivity for subclinical mastitis diagnostic method in sheep.

INTRODUCCIÓN

La producción de leche ovina se caracteriza por su rendimiento y características nutricionales, además de ser una alternativa para medianos y pequeños productores con poca capacidad de inversión.

En Uruguay las explotaciones para producción de leche ovina se originan desde 1987. El destino de esta producción es en su mayoría para la elaboración de quesos madurados (de Lima y col, 2005).

En nuestro país la normativa básica existente al respecto es la Resolución 27/011 del Ministerio de Agricultura y Pesca (MGAP, 2011) el cual aprueba el Manual para la Habilitación y Refrendación de Establecimientos Productores de Leche y Queserías Artesanales. El mismo incorpora lo dispuesto en el Decreto 164/04 del MGAP el cual es específico para Caprinos y Ovinos, y éste exige que se cumplan parámetros de higiene, calidad y sanidad de la materia prima para lograr un producto inocuo para el consumidor. Por otra parte, el Decreto 274/004 del MGAP indica límites de bacterias aerobias mesófilas, coliformes totales y *Staphylococcus aureus* en leche cruda y se establecen requisitos para acopiadores, transformadores y queseros artesanales en general (MGAP, 2004).

En el Anexo A de dicho Manual, en la sección sobre "Requisitos Particulares para la Habilitación de Establecimientos" productores de Leche Caprina y Ovina, establece la Calidad de la Leche, especificando máximo de recuento bacteriano aceptable (1.5 millones de UFC/ml), pero no se dispone un máximo de recuento de células somáticas (RCS) para leche ovina y caprina al igual que la normativa establecida por la Comunidad Europea en su Reglamento N°853/2004. En España la legislación (Decreto 640/2006) establece un límite máximo de gérmenes en leche cruda de oveja destinada a la elaboración de quesos, de 500.000 colonias de gérmenes/ml. En Estados Unidos el límite legal de RCS para la leche de oveja es de 1.000.000 células/ml (Lurueña, 2010).

Es de destacar que en leche ovina no es tan amplia la legislación como lo es para leche bovina. En lo que respecta a los parámetros composicionales y RCS es limitada la información en Uruguay.

Poder establecer niveles de RCS permitirá clasificar la leche y en base a esto decidir su destino. Determinar cómo afectan los distintos factores intrínsecos (fisiológicos, patológicos, raciales, genéticos, etc) y extrínsecos (clima, ordeño, manejo, etc) en el RCS, ya que es una herramienta muy importante conocer su modo de acción, para poder trabajar sobre ellos y prevenir efectos indeseables sobre la calidad de la leche.

Un factor extrínseco importante que puede influir en RCS, la incidencia de mastitis y el California Mastitis Test (CMT) es la rutina de ordeño.

También es importante el diagnóstico de patógenos comúnmente relacionados con mastitis clínica o subclínica mediante cultivos bacteriológicos y determinar su influencia en la calidad de la leche.

En el presente trabajo se estudió el RCS en leche ovina, este método evalúa la calidad de leche porque se relaciona con el estado sanitario de la glándula mamaria.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Características generales de la producción lechera ovina

Según información de la FAO para el 2010 la producción de leche ovina y caprina en América Latina y El Caribe representaba el 0,7% del total, mientras que la producción de leche bovina a nivel mundial representa la mayor parte, siendo más del 83%.

El stock mundial de ovinos es de alrededor de 1.043 millones de cabezas, los cuales se distribuyen por continente de la siguiente manera: Asia 44 %, África 25 %, Europa 12 %, Oceanía 10 %, América 9 % (FAOSTAT, 2011).

Según datos de la DIEA el stock de ovinos en Uruguay en el año 2006 era de 11,1 millones de ovinos y en el 2009/2010 fue de 7,7 millones de ovinos, lo que demuestra una disminución en el stock de ovinos (DIEA, MGAP 2011).

La producción de lana sucia mundial es de 1.985.797 de toneladas anuales según la FAO, 2011 y los principales países productores son: China, Australia y Nueva Zelanda. Según datos de la DIEA en el 2009/2010 Uruguay produjo 37,8 mil toneladas de lana.

La producción total de carne ovina a nivel mundial es de 7.911.505 toneladas, siendo los principales productores China, Australia y Nueva Zelanda (FAOSTAT, 2011). En Uruguay se producen 100 mil toneladas de carne ovina, año 2009/2010 (DIEA, MGAP 2011).

Mundialmente se producen 9.262.607 toneladas de leche ovina, que representan un 1.3% sobre el total de leche producida en el mundo según la FAO, 2011. En Uruguay no existen datos oficiales de litros de leche producidos, por lo que se incluyen datos de la región. Argentina y Chile han aumentado su interés por la elaboración principalmente de quesos de leche ovina. Para el año 2008 la producción de leche ovina se valoró para Argentina en 500.155 litros, con un total de 3.692 ovejas en ordeño y la producción de quesos fue de 90.937 kg (Facultad de Ciencias Veterinarias de Argentina, 2011) y en Chile en 20.500 y 22.000 litros anuales, es decir, alrededor de 3 a 4 toneladas de quesos (Ministerio de Agricultura de Chile, 2008).

La producción de leche ovina se destina casi en su totalidad a la elaboración de quesos, el resto a consumo directo y alimentación de corderos. La producción mundial de leche ovina se concentra en pocos países caracterizados por rentas bajas y condiciones ambientales poco favorables para la explotación de otros tipos de rumiantes. En estos países el principal destino de la leche es la elaboración de quesos para consumo humano (Facultad de Ciencias Veterinarias de Argentina, 2011).

La producción de leche se concentra en Asia, Europa y África 49%, 33% y 17.5% respectivamente, América solo representa el 0.4% (FAOSTAT, 2011). Sin embargo, el rendimiento por animal es significativamente mayor en la Unión Europea (UE). El 75% de la producción mundial se encuentra concentrada en 12 países (toneladas): China (1.529.000), Turquía (892.822), Grecia (773.000), Siria (705.554), Rumania (632.913), Somalia (590.400), España (550.000), Irán (449.000), Italia (417.839), Francia (265.390), Argelia (265.000) y Afganistán (201.000) (FAOSTAT, 2011).

Se estima que la mayor parte de la producción de leche de oveja (más del 90%) se destina a la producción de quesos, siendo la UE quien muestra el mayor desarrollo en producción de quesos, tecnologías, calidad de productos y agregado de valor. La producción de quesos de oveja encuentra su mayor grado de desarrollo en España, Italia, Grecia y Francia, siendo los últimos tres países los que explican el 89% de las exportaciones de queso de oveja registradas por la FAO. Europa y América centran su consumo fundamentalmente en queso (Facultad de Ciencias Veterinarias de Argentina, 2011).

En Uruguay, la primera experiencia en ordeño de ovinos lecheros fue en 1987 en el Departamento de Durazno, como una nueva alternativa para pequeños productores (Larrosa y Kremer, 1990), debido a que la producción de leche ovina y quesos es una buena opción para pequeños y medianos productores con poca capacidad de inversión (Suárez y col., 2007). La primera raza utilizada para tal fin fue la raza Corriedale (Larrosa y Kremer, 1990). En 1990 se realiza el Simposio Internacional sobre "Leche ovina y caprina, una nueva alternativa agroindustrial", organizado por el Departamento de Ovinos y Lanar de la Facultad de Veterinaria. En ese año se estableció otra cuenca organizada de productores, planta de Leche Ovina en Soriano. En 1991 se inicia la actividad de los tambos ovinos en INIA Las Brujas y Campo Experimental N° 1 de Facultad de Veterinaria Migueles. En el año 1992 la Facultad de Veterinaria hace un relevamiento de predios, existiendo 21 predios con 8.150 ovejas ordeñadas que producen 326.000 litros y 60 toneladas de queso por año. A partir de este mismo año surgen problemas de comercialización y consiguiente desestimulo de los productores, para luego en el 1999 quedar principalmente los tambos ovinos experimentales produciendo 30.000 litros de leche por año (Kremer, 2004).

Tabla I. Características generales de la leche ovina y bovina

	Oveja*	Vaca**
Agua	81,5%	87,3%
Materia Seca	18,5%	12,7%
Grasa	7,5%	4,0%
Proteínas	5,5%	3,25%
Lactosa	4,5%	4,6%
Cenizas	1,0%	0,7%
Rendimiento quesero (l/kg)	20% (5:1)	10% (10:1)
pH	6,65	6,7
Punto Crioscópico	-0,570°C	-0,540°C

*Características generales en leche ovina (Acero, 2002).

** Características generales en leche bovina (Walstra, 2001)

La leche ovina tiene características específicas, observables directamente y otras que están relacionadas a sus propiedades físicas y químicas. El color de la leche es blanco nacarado y más viscosa, lo que se vincula con la riqueza de sus componentes (Buseti, 2000). Se caracteriza por su mayor contenido en grasa, por su extracto seco y rendimiento industrial (rendimiento quesero), en comparación con

la leche bovina (Tabla I). Se consume principalmente en forma de productos derivados, siendo principalmente la elaboración de quesos. La que está dirigida al turismo o a un mercado bien específico, siendo un producto bien aceptado por sus consumidores (Suárez, 2004; Bergonier y Berthelot, 2003). Además, tiene cualidades gastronómicas y nutraceúticas lo que implica que sus productos sean muy valorados en países de la Unión Europea, pero en nuestro país la lechería ovina es una actividad no consolidada (Suárez y col., 2007). Uno de los mayores problemas que enfrentan estos subproductos de la leche ovina es la comercialización y que junto a dificultades en lo productivo desmotivan a los productores y provocan el cierre de numerosas lecherías (Suárez y col., 2007).

Las razas mayormente utilizadas en el área del Mediterráneo, principal zona productiva de leche ovina, son: Manchega, Churra, Latxa, Lacaune, Sarda, Comisana, Manech, Assaff y Awassi entre otras (Larrosa y Kremer, 1990).

La raza Milchscaf (también llamada Frisona u ovino Frisón) es considerada una raza lechera de alta producción, por este motivo se ha introducido en el Uruguay por el INIA, así como en varios países (Boyazoglu, 1980; Ugarte y col, 2001). Esta raza es originaria de Frisia (Alemania), donde fue seleccionada por su aptitud lechera por más de 500 años. Alcanza niveles de producción de hasta 550 a 600 litros por lactancia que dura aproximadamente 180 a 210 días (Farid y Fahmy, 1996). Se caracteriza por su elevada prolificidad y habilidad materna, la tasa de parición puede llegar a 210-230% en condiciones adecuadas de cría y manejo. Con una alta velocidad de crecimiento de sus corderos y con una precocidad sexual que puede alcanzar la pubertad a los 7 meses. Producen canales magras, con pesos aproximados de 80 kg las hembras y 120 a 130 kg los machos, se caracteriza también por producir además un vellón de lana blanca que puede alcanzar los 3 a 6 Kg, de muy buen largo de mecha con un rango de 11 a 20 cm, un diámetro promedio de 40 μ m y buen rendimiento al lavado (Farid y Fahmy, 1996).

En la Universidad de la Republica, Facultad de Veterinaria se realizaron ensayos comparando las características reproductivas y productivas (producción de lana, calidad y producción de leche) de ovejas Corriedale y el cruzamiento de East Friesian con Corriedale, los resultados en la producción de leche fueron superiores para las cruza (Kremer y col., 2010). Otro estudio evaluó en diferentes predios de Uruguay la producción de leche de cruza de East Friesian en el cual el resultado fue que la máxima cantidad de leche producida fue de 100 litros (Kremer y col., 2003) a diferencia de datos internacionales (Farid y Fahmy, 1996) donde la raza East Friesian llega a producir entre 350 a 650 litros por lactancia.

En nuestro país en un estudio realizado en la raza Corriedale se reportan amplias variaciones en contenido de materia grasa (7,16% \pm 0,86), proteína (6,32% \pm 0,65) y lactosa (5,27% \pm 0,30) dependiendo de la raza, edad, año y sistema de ordeño (Kremer y col, 1996). Los datos de composición de leche ovina son escasos y limitados, al igual que los estudios sobre elaboración de productos o caracterización de los productos elaborados (de Lima y col., 2005). En Uruguay se elabora un queso curado, artesanal o semi-industrial, con fermentos nativos, a base de leche de oveja de raza Frisona Milchscaf, el cual se comercializa en el mercado interno. Este queso fue elaborado por el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria en conjunto con la Facultad de Agronomía de la Universidad de la República (INIA, 2012).

Determinación de cantidad de células somáticas en leche ovina

El RCS es un procedimiento común, ampliamente utilizado para evaluar el estado inflamatorio de la glándula mamaria. Cuando los microorganismos causantes de mastitis invaden un medio de la ubre y el número de leucocitos se incrementa en la glándula mamaria, esto se traduce en un aumento de las células somáticas en la leche obtenida en respuesta a la infección (Barberis y col., 2002).

Se puede realizar el RCS en el laboratorio a partir de leches frescas extraídas individualmente de cada cuarto en caso de vacas o medios mamarios en ovejas (Sosa y Feder, 1971) y el análisis del recuento se realiza por métodos automáticos mediante equipos instrumentales que llevan a cabo el recuento de partículas por tamaño (Coulter-Counter) o por tinción de los núcleos celulares (Fossomatic), también por método directo de recuento en microscopio (metodología según Prescott-Breed), el cual es el método de referencia y se utiliza para calibrar los otros anteriores (Pinto, 1998; Lurueña, 2010).

El RCS en leche refleja principalmente el número de neutrófilos que migran desde la sangre a la glándula mamaria en respuesta a infecciones intramamarias. Es medido mensualmente, por lo tanto, se puede interpretar como un efecto de la infección y un buen indicador indirecto de la presencia de mastitis subclínica hasta la crónica. Existe una buena correlación genética entre RCS y la infección bacteriana, lo que indica que RCS y las infecciones subclínicas están muy relacionados. Entonces, existe evidencia de que la selección basada en el RCS debería disminuir la incidencia de mastitis crónicas (Rupp y col, 2009).

La leche normal de la glándula mamaria de ovejas sanas contiene células somáticas, pero en un número bajo, en estos casos se pueden encontrar macrófagos (46-84%), neutrófilos (2-28%), linfocitos (11-20%) y células de tejido glandular (células epiteliales) (Barberis y col., 2002; Moroni y col., 1998, Haenlein, 2002).

Desde hace un tiempo atrás ha habido un esfuerzo en los países industrializados para aplicar planes de pago para leche de cabras y ovejas basado en el RCS y el contenido de proteínas, similares a los observados para la leche bovina (Leitner y col., 2007). Esto es así porque el RCS ha sido aceptado como el mejor índice para evaluar tanto la calidad de leche como para predecir una posible infección de la glándula mamaria. Es un método de evaluación individual muy eficiente para determinar la prevalencia y detección de mastitis subclínica (Suárez y col., 2002; Haenlein, 2002; Bergonier y Berthelot, 2003).

Normalmente, la leche bovina presenta menos de 200.000 RCS/ml, en ubres sanas (Echeverri Zuluaga y col., 2010), pero en leche ovina existe una gran variación entre los niveles aceptados de RCS en los diferentes países y las consecuencias en el producto final procedente de leches con alto RCS no han sido bien determinadas aún, pudiendo haber una variación importante entre calidad y rendimiento (Leitner y col, 2007; Bergonier y Berthelot, 2003; Suárez y col., 2002; Ferreira, 2004).

Algunos trabajos han establecido un criterio de calidad de la leche ovina de acuerdo con el RCS, que indicaría que una leche de alta calidad contiene menos de 800.000 RCS/ ml, leches de calidad media con un RCS inferior a 1.500.000 RCS/ml y las de

baja calidad mayor de 1.500.000 RCS/ml (Leitner y col., 2007). A su vez estos mismos autores indican que leches que contienen más de 3,5 millones RCS/ml no deben ser aceptadas para el consumo humano. Marguet y col., 2000 determinaron un máximo en el recuento de 200.000 RCS/ml para leche ovina considerada normal en razas Texel, Frisona y sus cruza, lo que estaría muy por debajo de los niveles antes mencionados para leche de alta calidad (800.000 RCS/ml).

En cuanto al rendimiento de la leche bovina que contiene un alto RCS algunos trabajos realizados en bovinos han podido demostrar que existe una relación entre el alto RCS y variaciones en la producción y composición de la leche, estos cambios se comienzan a ver con recuentos celulares por encima de 150.000 células/ml, el tejido productor de leche al estar dañado, comienza a producir menos leche, lactosa, grasa y proteínas, en particular la caseína. Estas variaciones provocan una alteración en el rendimiento y las características del producto final. El queso no cuaja bien y pierde muchos sólidos en el suero, se forman cuajadas con poca firmeza (Ferreira, 2004; Bouman, 2010).

Un incremento en concentración de células somáticas en la leche puede convertir cantidades significativas de plasminógeno en plasmina, la cual también tiene un papel importante en la maduración del queso. Se ha sugerido que algunos cambios en el queso como un elevado contenido de humedad y una textura defectuosa y quebradiza pueden ser debido a la proteólisis llevada a cabo por la plasmina. El tiempo de coagulación y las propiedades de formación de la cuajada se verían afectadas de forma significativa solamente después de una intensa proteólisis causada por esta enzima (Lurueña, 2010). Un excesivo aumento de la plasmina, la cual hidroliza la caseína, podría provocar un secado de las secreciones de la mama, lo que se asocia con baja secreción de grasa y proteínas (Lurueña, 2010).

Con respecto a la hidrólisis de la caseína, los estudios son escasos, pero se ha demostrado un descenso en α -caseína y β -caseína al aumentar los RCS (Lurueña, 2010).

El aumento de ácidos grasos libres (AGL) provocados por elevados RCS puede causar el desarrollo de sabores rancios en la leche y en el queso elaborado a partir de ella. El aumento de AGL en la leche de ovejas con alto RCS puede deberse a que los leucocitos contiene lipasas o carboxilestearasas que pueden contribuir a la lipólisis en las leches mastíticas, estas enzimas lipolíticas dañan la membrana del glóbulo graso, exponiendo la grasa en la leche a la degradación por lipoproteínas, lipasas de la leche (Lurueña, 2010).

En cuanto al rendimiento quesero según el RCS, si se elabora con leche de elevado RCS, se produce un deterioro de la cuajada durante la sinéresis, con un largo tiempo de coagulación y una agregación de la cuajada débil. Esto se debe a la hidrólisis parcial de la α -caseína y de la β -caseína causada por la plasmina, daría lugar al incremento del contenido de humedad y la reducción de la caseína en la cuajada, lo que se traduce en un menor rendimiento quesero (Lurueña, 2010).

Relación RCS y etapa de lactancia

El momento de la lactación tiene influencia directa sobre la cantidad de leche producida, ésta comienza en el parto y la producción aumenta en forma considerable en las primeras semanas (Buseti, 2007). En el transcurso de la lactancia es normal

que ocurra un aumento del contenido celular, especialmente en los últimos estadios. Este significativo aumento con los RCS superiores al límite máximo (200.000 RCS/ml), en la mitad y al final de la lactancia podría estar ocasionado por el ordeño a máquina ya que la relación entre el ordeño mecánico y la respuesta celular es positiva (Marguet y col., 2000).

El principal factor que afecta el RCS son las infecciones intramamarias pero existen factores no infecciosos que también alteran el RCS como el estado fisiológico, factores de manejo y genéticos (Bergonier y Berthelot, 2003). La producción de leche y el tiempo de ordeño, también influyen en el RCS. En cuanto a las características del tipo de ubre, se ha podido mostrar que las ubres con buena conformación son menos propensas a mastitis subclínica y eventualmente a presentar un mayor RCS (Legarra y Ugarte, 2005).

En exámenes bacteriológicos realizados mensualmente, se encontraron medios mamarios con una prevalencia de infección mayor en los casos que el RCS era alto, estos valores se presentaron en ovejas postparto, indicando que estas ovejas son más susceptibles a padecer mastitis subclínica. Sin embargo estos animales tienen una mayor capacidad para limitar las infecciones durante el período perinatal, para eliminar las infecciones durante la lactancia y cuantitativamente para limitar el proceso inflamatorio y sus consecuencias clínicas, esto puede deberse a la resistencia desarrollada por estas ovejas (Rupp y col., 2009).

Relación RCS y frecuencia de ordeño

Con la finalidad de avanzar en el conocimiento para lograr una mejor calidad de vida para los productores y mejor eficiencia en la producción de leche, como estrategia para motivar la explotación de la lechería ovina, distintos autores han planteado el estudio de los efectos que causa sobre la producción y la calidad de la leche, la supresión de un ordeño diario o semanal (Castillo, 2008; Hervás y col, 2006).

Se ha considerado que la principal fuente de variación del número de células somáticas son: el sistema de ordeño y manejo, la alimentación, tratamiento de secado, higiene de la ubre y variaciones genéticas (Acero, 2002). Pero no se vieron cambios significativos en RCS cuando se varió la frecuencia de ordeño de uno a dos veces por día (Hervás y col, 2006; Santibáñez y col, 2009; Castillo, 2008), mostrando un valor promedio de 530.000 RCS/ml, lo que se considera dentro del rango fisiológico (Salgado, 2007).

Número de lactancias, edad del animal y el nivel productivo.

La producción de leche interfiere en el RCS, aumentando el RCS a medida que disminuye la cantidad de leche: al final de la lactancia la leche contiene un mayor RCS (Acero, 2002). Las ovejas jóvenes producen menos leche que animales de mayor edad y la máxima producción se da entre la tercera y cuarta lactación, luego de la cual la producción va decreciendo. También se afirma que existe una correlación positiva entre el número de lactancias y el RCS (Busetti, 2007).

RCS, CMT y mastitis.

El CMT es un método de diagnóstico indirecto y subjetivo para determinación de la incidencia de mastitis subclínica en ovinos y bovinos lecheros y no muestra diferencias significativas entre razas ovinas (González y Cármenes, 1995). Los resultados obtenidos por el método de CMT tiene una alta especificidad y sensibilidad, aún mayores que el RCS y el cultivo bacteriológico (Suárez y col., 2002; González y Cármenes, 1995). También se ha encontrado una buena correlación entre CMT y estado de sanidad de la glándula mamaria, demostrando así el gran valor que tiene el CMT como una herramienta de diagnóstico para las ovejas lecheras (Suárez y col., 2002). Apolo y col., 1998 en su estudio de mastitis subclínica obtuvieron como resultado que ante un CMT positivo con cultivo bacteriológico positivo (sin alteración de la glándula mamaria, ni de la secreción mamaria) era considerado mastitis subclínica, lo que coincide con los datos de Stefanakis y col., 1995, quienes también indicaron que dentro de esta situación el RCS es mayor a un millón. Sin embargo en un estudio realizado por Pradieé y col., 2012 en ovejas Corriedale y Texel en la región de Capão do Leão, Brasil demostraron que los grados de CMT y el RCS no está relacionado y su aplicación es limitada, recomiendan para confirmar el diagnóstico de mastitis el diagnóstico bacteriológico. En dicho estudio también se determinó que el CMT presenta baja sensibilidad en comparación con el aislamiento bacteriano, a su vez existe un número alto de reacciones falsas positivas y negativas.

Los datos de ambos métodos de diagnóstico (RCS y CMT) son ampliamente utilizados en conjunto como análisis de referencia para predecir el estado infeccioso de medios mamarios. En un trabajo realizado por Suárez y col., 2002, se encontró una alta relación entre CMT y RCS, se estimó el número de células somáticas que se podían encontrar según nivel de CMT. Para un CMT de nivel 0 se corresponde con un promedio de células somáticas de 223.576 RCS/ml de leche, en un nivel 1 de CMT el promedio es de 245.248 RCS/ml, en CMT de nivel 2 corresponde a 397.778 RCS/ml, un promedio de 1.159.109 RCS/ml en un CMT nivel 3. En este trabajo se clasificaron 4 niveles de CMT, siendo el último que correspondió con un RCS de 2.460.833 RCS/ml. Sin embargo, existen estudios que predicen con una exactitud del 82% un RCS con 440.675 RCS/ml y una puntuación de 1 en CMT representa medios mamarios no infectados.

La mastitis es la inflamación del parénquima de la glándula mamaria, independientemente de su causa, con cambios físicos y químicos de la leche y alteraciones patológicas en el tejido glandular. Las principales modificaciones son cambios en el color, presencia de coágulos y un gran número de leucocitos (Radostits y col., 2001). La mastitis clínica se caracteriza por la presencia de síntomas locales (calor, dolor, inflamación, entre otros) (Las Heras y col., 1998). La mastitis subclínica es una inflamación que no es detectable clínicamente, afectando negativamente la producción. Sin embargo, lo que indica la mastitis subclínica en ovinos y caprinos en términos de niveles de RCS, resultados de las pruebas de CMT y de cultivos bacteriológicos no están definidas tan claramente como para los bovinos lecheros (Menziés y col., 2001).

La leche proveniente de animales con mastitis clínica es separada porque los animales afectados pueden detectarse a la inspección. Esta enfermedad provoca grandes pérdidas económicas debido a la disminución de la producción de leche (afectando crecimiento de corderos), mortalidad de ovejas y corderos, costos de tratamientos los que pueden ser aplicados en algunos de los casos pero en la mayoría lleva a la pérdida irreversible de la función de la glándula y degeneración de la misma (Leitner y col., 2007).

Las consecuencias de los tratamientos con antibióticos de las mastitis clínicas, cuando estos animales no son bien identificados y su leche es remitida, provoca la presencia de antibióticos en leche llevando a provocar problemas, en la salud (reacciones alérgicas, resistencias), en la industria (interferencia con los cultivos iniciadores en la elaboración de queso y yogur) y sanciones al productor (Parra, 2003). En el caso de las mastitis subclínicas la calidad de la leche para consumo o elaboración de subproductos puede verse afectada ya que estos animales son ordeñados de forma regular, mezclando su leche con la de animales sanos (Leitner y col., 2007). La incidencia de mastitis subclínica en ovinos es de un 17,5% (Albenzio y col., 2001). Existen estudios que revelan una prevalencia de mastitis subclínica de 18,3% (Al-Majali y col., 2002) en ovejas Awassi en el sur de Jordania y de 19% en un estudio realizado por McDougall y col., 2002, en Vermont, USA.

Relación de agentes Etiológicos con CMT y RCS

Otro factor importante afectado es la higiene y calidad del producto final, con el consecuente riesgo de infección o intoxicación (por presencia de toxinas bacterianas) de los consumidores por presencia de bacterias en productos elaborados a partir de leche cruda entre otras: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. (Bergonier y Berthelot, 2003). Los aislamientos que dan lugar a mayores reacciones al CMT irían acompañados de mayores recuentos bacterianos en leche (Las Heras y col., 1998).

Los agentes etiológicos se clasifican para su estudio como patógenos mayores y patógenos menores de acuerdo al daño que producen a la glándula mamaria. Los patógenos mayores son *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp., *Pasteurella* spp., *Pseudomona* spp. y Micoplasmas. Los patógenos menores u oportunistas son *Micrococcus* spp., *Corynebacterium* spp. y *Bacillus* spp. (Suárez y col., 2002; Bergonier y Berthelot, 2003; Barberis y col., 2002; Moroni y col., 1998). Los medios glandulares mamarios con más de 870.000 RCS/ml podrían asociarse con agentes patógenos menores y 1.900.000 RCS/ml o más se asocian a agentes patógenos mayores (Suárez y col., 2002). Los *Staphylococcus* presentes frecuentemente son: *Staphylococcus aureus* (se caracteriza por ser coagulasa positiva), *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus* Coagulasa Negativa (ECN) (Haenlein, 2002).

Existe una relación significativa entre el grupo bacteriano aislado de mastitis subclínicas ovinas ECN, *Staphylococcus* Coagulasa Positiva (ECP), *Streptococcus* spp., o *Corynebacterium* spp., el CMT y los recuentos bacterianos en leche (Haenlein, 2002).

Se ha observado una reacción inflamatoria y una eliminación bacteriana mayor en leche con mastitis causadas por ECP y *Streptococcus* spp., seguidos de los ECN y

Corynebacterium spp. Los aislamientos de la bacteria del genero *Staphylococcus* spp. con mayor poder hemolítico y con mayor reacción a la prueba de la DNAsa darían lugar a reacciones más intensas al CMT, RCS y a mayores recuentos bacterianos en la leche de los animales infectados (González y Cármenes, 1995; Las Heras A y col., 1998; Haenlein, 2002).

Aunque estos estudios revelan que el grupo de ECN tiene una baja patogenicidad y se encuentra asociado a inflamaciones leves de la mama, se ha puesto de manifiesto la importancia de estos microorganismos como agentes causales de mastitis ovinas clínicas y subclínicas ya que constituyen el grupo con mayor prevalencia en esta patología y aislado con mayor frecuencia (González y Cármenes, 1995). Este grupo bacteriano incluye más de 50 especies y subespecies, las especies más comunes de ECN aislada de mastitis bovina son *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus epidermitis* y *Staphylococcus simulans*. En el caso del *Staphylococcus hyicus* es variable a la reacción de la coagulasa (Stanchi y col, 2010), pero existen autores que lo clasifican dentro del grupo *Staphylococcus* coagulasa negativa (Navarro, 2009). Por ello actualmente no sería correcto agrupar a todos los ECN como patógenos menores en el ganado ovino, sino que sería adecuada una reclasificación de los mismos según su patogenicidad mamaria (Torres, 2010).

En un estudio sobre mastitis subclínica en ovejas realizado en Uruguay por Apolo y col., 1998, se aisló principalmente *Staphylococcus aureus* (46%) y ECN (18%).

Dado que en Uruguay la información con respecto a los niveles normales de RCS es escasa y a nivel mundial es muy variable, es importante profundizar en el tema para poder establecer límites normales de RCS.

También consideramos que es importante conocer la relación que tiene el CMT como método de análisis indirecto con la salud de la ubre.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la cantidad de células somáticas en leche ovina, la variación individual a lo largo del período de ordeño y con distintos regímenes de ordeño, su relación con CMT y mastitis subclínica.

Objetivos específicos

- Determinar la variación de células somáticas a lo largo del periodo de ordeño y su variación individual según, número de lactancias, edad del animal y el nivel productivo.
- Aislar e identificar microorganismos en muestras de leche con mayor grado de CMT.
- Evaluar el CMT como indicador del RCS.

HIPÓTESIS

Existe variación del recuento de células somáticas a lo largo de la lactancia.
El régimen de un ordeño diario provoca la disminución del RCS.
El recuento de células somáticas está directamente relacionado con el CMT.
Altos recuentos de células somáticas está relacionado con patógenos presentes en la ubre.

MATERIALES Y MÉTODOS

General

Los ensayos se realizaron en 70 ovejas Milchschaaf que integran un sistema lechero en el Campo Experimental N° 1 de la Facultad de Veterinaria (Canelones, Migueles). Las ovejas, individualmente identificadas, se encarneraron en marzo/abril, se les realizó la esquila preparto en el mes de julio, el período de parición fue en agosto-setiembre. El destete se realizó a los 30 días posparto aproximadamente con 10 Kg de peso vivo. Luego las ovejas fueron ordeñadas rutinariamente a máquina entre setiembre y diciembre.

El ordeño mecánico se realizó con máquina de ordeño para ovinos, con un nivel de vacío 44 kpa, 90 pulsaciones/min y una relación ordeño/masaje 65:35. La ubre no se lavaba, precediéndose regularmente al apurado a máquina sin repaso manual. Se conformaron dos grupos con distintas rutinas de ordeño de uno y dos ordeños diarios. Al inicio y fin del período de ordeño, las ovejas fueron pesadas y se determinó la condición corporal (Jefferies, 1961).

Durante el período que va desde el último tercio de gestación hasta el secado de las glándulas, la alimentación se hizo en base a un pastoreo rotativo sobre praderas sembradas.

Grupos experimentales

Se conformaron dos grupos, cada uno identificado con pintura de distinto color. Cada lote de ingreso al ordeño se dividió al azar en dos, manteniendo la proporción de adultas y borregas. El primero recibió doble ordeño diario, durante 100 días, se denominaron GrupoDoble (GD) y el segundo grupo se le realizó un ordeño diario en la mañana, durante 100 días y se lo nombraron como GrupoSimple (GS).

Métodos

Se realizó el control lechero con el método A4, ICAR (2007). El primer control se llevó a cabo en un máximo de 52 días postparto con no más de 35 días de ordeño, los siguientes controles se realizaron cada 30 días como máximo. Para los mismos se emplearon medidores volumétricos con una precisión de 10 ml para realizar las mediciones de las fracciones del ordeño y cada uno de los controles. Se tomaron

muestras individuales durante la mañana y la tarde en cada uno de los controles. Las muestras fueron acondicionadas con dicromato de potasio para su transporte al laboratorio, para análisis de recuento celular. El criterio de secado fue de una producción individual menor a 200 ml/día. En cada control lechero también se procedió a tomar una muestra representativa del tanque de frío para la determinación de grasa, proteína, lactosa mediante absorción de radiación infrarroja y conteo celular. La metodología que se utilizó para el recuento celular tanto de las muestras de tanque de frío como individuales fue por citometría de flujo (Norma IDF 41C:200) en el laboratorio de COLAVECO. La muestra se tomó: homogeneizando la leche del tanque de frío durante 5 minutos y luego con cucharón limpio se extrae una muestra de 60 ml. Las muestras identificadas se remitieron refrigeradas entre 1 y 7 °C con hielo o refrigerante.

CMT y extracción de muestras para recuento celular y cultivo:

Al inicio y fin de período de ordeño (setiembre y diciembre), se llevó a cabo el muestreo de leche de cada oveja y cada medio mamario, en todos los grupos; en días diferentes al control lechero.

Procedimiento de muestreo:

Las ovejas una vez que entran a la plataforma de ordeño, se les lava los pezones con agua y se secan con toallas descartables. Posteriormente, se limpia cada pezón con algodón embebido con alcohol 70° GL, descartando los primeros chorros y se extraen muestras (20ml) manualmente en forma aséptica (con previo lavado de manos con detergente y posterior desinfección con alcohol 70°) en un frasco estéril, para análisis microbiológicos y RCS. A su vez se extrajo otra muestra (10ml) para CMT de la misma oveja de cada pezón. En cada caso los frascos se cierran inmediatamente luego de extraída cada muestra, se debe identificar el frasco con el registro que corresponde al animal que le fue tomada dicha muestra y a que pezón corresponde (derecho o izquierdo). Las muestras fueron transportadas refrigeradas a 4°C (Pinto y col., 1998). Los análisis microbiológicos y de recuento directo en microscopio de células somáticas se realizaron en el Laboratorio de Ciencia y Tecnología de la Leche y de la Universidad de la República. Se remitieron al laboratorio todas las muestras para RCS y se seleccionaron 25 muestras (aquellas que presentaron mayor grado de CMT) para análisis microbiológico en diferentes medios de cultivo para aislamiento e identificación de diferentes grupos bacterianos.

California Mastitis Test (CMT)

El CMT de Schalm y Noorlander consiste en la mezcla del reactivo con la leche (0,2 ml de cada uno), si la leche contiene más de 500.000 polimorfonucleares/ml se verá floculación de la leche. El reactivo que químicamente pertenece al grupo de los tenso-activos, contiene sales de hidrocarburos de cadena larga (detergentes), este hace estallar la pared celular de los leucocitos dejando en libertad el protoplasma, gelifica las proteínas y la mezcla toma un aspecto viscoso, gelatinoso, llegando al estado de "gel" espeso. La lectura se realiza de forma visual, la reacción

desaparece en unos 20 segundos, por este motivo debe hacerse rápidamente y la calificación que se da es en base a la formación de gel y cuanto mayor es la formación de gel, mayor es la calificación. La clasificación para los grados de CMT fue de 0, 1, 2, 3, 4. Siendo nivel 0 sin formación de gel y el nivel 4 formación de un coágulo sólido visualizándose claramente (Sosa y Feder, 1971).

Recuento de células somáticas (RCS)

El recuento de células somáticas se realizó conforme a la metodología Prescott–Breed, 1910 citada por Sosa y Feder, 1971 y Norma IDF 148:1995. Es un método directo de referencia para determinación de recuento de células somáticas. El principio de este método se basa en el examen citológico de la leche, que permite deducir en cierto grado la naturaleza de los procesos infecciosos mamarios, debiendo ser confirmados estos resultados con pruebas bacteriológicas y celulares. La extensión de 0,01 ml de la muestra de leche, usando una micropipeta sobre un portaobjeto con una superficie delimitada de 1cm² (se preparan 2 áreas de iguales medidas en el mismo portaobjeto). Secar a temperatura ambiente, realizar la tinción con azul de metileno y secar nuevamente, posteriormente se procede al recuento de células en un microscopio de inmersión de 400 - 1000X, de diámetro igualmente conocido (calculado del Factor de Microscopio), este método permite la evaluación de la cantidad de células en la leche y la determinación de la forma leucocitaria (Pinto y col., 1998).

Aislamiento e identificación de microorganismos

El examen bacteriológico se realizó según Calvino, 2001 se partió de 25 muestras con CMT de grados mayores.

Se utilizaron 0.05 ml de cada muestra, se sembró empleando la técnica de estrías en superficie en 3 medios sólidos:

Agar Sangre ovina (5%): se empleó para el aislamiento y cultivos de diversos microorganismos (sobre todo patógenos) exigentes y para la determinación de sus formas hemolíticas. Se incubó a 37°C durante 24 a 48hs y luego se realizó el estudio y determinación de las formas de hemólisis (Mcd LAB, 2010).

Medio Agar Edwards: se empleó para determinación de estreptococos y enterococos (Demeter, 1969). La búsqueda de *Enterococcus* spp. es particularmente importante debido a su origen fecal, para el control higiénico de la leche, ya que presentan una relativa termorresistencia y cuando se encuentran en grandes cantidades, originan elevadas tasas bacterianas en leches pasteurizadas o pueden causar otros efectos indeseados. Por otra parte, el *Streptococcus* spp. de mayor importancia como causante de la inflamación de la mama (mastitis) es el *Streptococcus agalactiae* (Demeter, 1969). *Streptococcus agalactiae* (esculina negativo) tiene un buen crecimiento en este medio, son colonias azules sin fermentación, los otros estreptococos dan colonias de color negro por la presencia de esculina. *Enterococcus faecalis* tiene buen crecimiento, produce colonias de color azul con fermentación (esculina positivo) (Oxoid, medio Edwards).

Agar-bilis-rojo violeta (VRBA): La mezcla de sales biliares y el cristal violeta inhiben las bacterias Gram-positivas. El Rojo Neutro es un indicador de pH. Este medio se empleó como medio selectivo y diferencial para la detección de bacterias Gram negativas y de coliformes en la leche (APHA, 2001).

La lectura se realizó a las 24 y 48hs (incubación 35-37°C) teniendo en cuenta la siguiente metodología:

-Más de 3 colonias de características iguales: posible agente etiológico.

-Hasta 3 colonias diferentes: es admisible.

-Más de 3 colonias diferentes: se considera contaminación de la muestra, se tiene que volver a muestrear (en nuestro trabajo ninguna de las siembras coincidió con esta opción).

Luego se identificaron y repicaron las colonias sospechosas en caldo de enriquecimiento (Brain Heart Infusión, BHI) y se incubaron por 18 a 24hs, a 35°C.

Para la caracterización y detección de los posibles agentes etiológicos se realizó el siguiente procedimiento:

- A todas las colonias aisladas se les hizo Test de catalasa: El Peróxido de Hidrógeno es el reactivo utilizado, es de utilidad para separar la Familia Micrococaceae (catalasa positivo) de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* (catalasa negativo) (APHA, 2001).
- Se realizó la tinción de Gram: a partir de caldo BHI, a todas las colonias sospechosas de ser posibles agentes etiológicos.
- El ensayo VRBA con MUG: se utilizó para confirmar la presencia de *E. Coli* en colonias sospechosas desde BHI que provenían del crecimiento en VRBA y Agar Sangre. Está basado en la actividad enzimática de la β -glucuronidasa (GUD). El sustrato utilizado 4-metilumbeliferil-D-glucurónido (MUG) es para detectar la actividad de la glucuronidasa por fluorescencia bajo luz UV, más del 95% de *E. coli* producen GUD (APHA, 2001).
- Medio DNAsa: las colonias sospechosas de *Staphylococcus aureus* que crecieron en Agar Sangre se sembraron en medio sólido que contiene verde de metilo el cual se combina con DNA altamente polimerizado. Cuando la combinación no ocurre, por acción de la enzima desoxirribonucleasa (DNAsa), se produce una decoloración del medio. La formación de un halo transparente alrededor de la siembra indica presencia de DNAsa. La presencia de DNAsa permite diferenciar *Staphylococcus aureus* que es la única especie dentro del género *Staphylococcus* spp. que posee DNAsa (APHA, 2001).
- Test de la coagulasa: Esta técnica nos permite diferenciar *Staphylococcus* coagulasa positivo (*S. aureus*, *S. intermedius*, *S. delphini* y *S. schleiferi* subsp. *coagulans*.) de los *Staphylococcus* coagulasa negativo. La determinación de la coagulasa libre se realiza colocando 0,2 ml del cultivo desde caldo BHI hacia un tubo estéril y se agrega plasma de conejo con EDTA rehidratado (liofilizado). Se incuba a 35-37°C y se examina cada 30 minutos durante 6 horas (APHA, 2001). (Stanchi y col., 2010; APHA, 2001).

- Medio Cetrimide: es selectivo para *Pseudomonas aeruginosa*. Este medio cetiltrimetilamonio bromuro, sirve para conseguir una notable inhibición de la microbiota acompañante (BD, 2009). La siembra se realiza en placas en superficie y se lleva a incubar a 35-37°C durante 48hs. Las colonias de *Pseudomonas aeruginosa* forman un pigmento verde azulado (piocianina) y son fluorescentes a la luz UV (BD, 2009).
- La prueba de CAMP: se utiliza para la identificación presuntiva de *Streptococcus agalactiae* (grupo B de Lancefield). En esta prueba se observa un efecto sinérgico que se produce al interactuar el factor CAMP producido por cepas de *S. agalactiae* con la hemolisina β de *Staphylococcus aureus*. Ambos son productos extracelulares que difunden en el medio de cultivo para producir una zona de potenciación de la hemólisis completa en forma de flecha en el lugar donde se contactan las dos estrías, cuando se utilizan placas de Agar Sangre. Una vez inoculados, los medios de cultivo deben ser incubados a 35-37°C por 18-24 horas. La identificación específica de *Streptococcus agalactiae* es a través de antígeno específico del grupo y métodos moleculares de detección, la cuales no se realizaron en este trabajo (Brizuela, 2007).
- Prueba de crecimiento (tolerancia) en 6.5% de NaCl: permite diferenciar las especies de *Enterococcus* spp. (crecimiento positivo en presencia de 6.5% de NaCl) de los *Streptococcus* del grupo D (crecimiento negativo en presencia de 6.5% de NaCl). El microorganismo en estudio se inocula en un caldo tripticasa soya conteniendo 6.5% de NaCl. Luego de un periodo de 18-24 horas a 35-37°C se observa la presencia o ausencia de crecimiento en el medio de cultivo (Stanchi y col, 2010; APHA, 2001).

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico, se utilizó el paquete estadístico STATA (2010), la comparación entre grupos de producción de leche se hizo por análisis de varianza (ANOVA). En la comparación de contaje celular, se realizó previamente transformación logarítmica, donde los efectos testeados fueron edad, número de ordeño e interacción entre ambas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo se utilizaron 70 ovejas Milchschaf, el período de ordeño fue de 102 días, las ovejas fueron ingresando semanalmente al ordeño según fecha de parición.

El peso promedio al inicio del ordeño fue de 45,23 Kg y una condición corporal de 1,64 y al final del ordeño fue de 56,58 Kg y condición corporal de 2,2. Con respecto a esto vemos que al inicio del periodo de ordeño el peso y la condición corporal fueron bajos aumentando considerablemente hacia el fin de la misma. Esta baja condición corporal al inicio posiblemente se deba a que los últimos meses de gestación son en invierno donde las pasturas son de baja calidad.

Tabla II. Media y desvío estándar de producción de leche (litros) corregido a los 100 días de ordeño según frecuencia de ordeño diaria y edad

	n		n		P > F
Frecuencia		1 ordeño		2 ordeños	
	34	67,43±25,00	35	96,41±26,88	**
Edad		Borregas		Adultas	
	15	69,41±20,83	54	85,66±30,87	*

*. $P < 0.05$. **. $P < 0.01$.

En la Tabla II se observa que la producción de ovejas con 2 ordeños diarios es de 96,41 l promedio en 100 días, en cambio en ovejas ordeñadas 1 vez al día producen 67,43 l promedio, concluyendo que la supresión de un ordeño diario, implica una disminución significativa en la producción. Según Kremer y col., 2009, en un estudio realizado con ovejas Corriedale y cruza Milchschaaf en el Campo Experimental N° 1, Migués, de la Facultad de Veterinaria reporta que la producción de la raza Milchschaaf presente en Uruguay es de 100 litros en una lactancia de 100 días. Las diferencias observadas en países europeos con producciones de 350 a 650 litros por lactancia podrán deberse a diferencias genética y/o adaptación de la raza a distintos climas (Farid y Fahmy, 1996).

En un estudio realizado por Hervás y col., 2006 en España con ovejas Assaf, donde la producción disminuye notablemente al suprimir dos ordeños semanales, atribuyendo que esta respuesta estaría condicionada por la morfología y capacidad de distensión de la ubre, también apuntan a la importancia de la raza en el efecto de la supresión, ya que existen razas con importantes pérdidas productivas (Sarda). Al igual que en los resultados de Castillo, 2008 en ovejas Manchega y Lacaune, con frecuencia de uno o dos ordeños diarios, demostraron que al cambiar de uno a dos ordeños diarios, se estimula mayor producción de leche. Este autor afirma que el aumento de producción está dado por un aumento de las células secretoras mamarias.

La edad también influye con cambios significativos en la producción, a mayor edad mayor producción, ovejas adultas producen más que las borregas.

En una revisión bibliográfica realizada por Peña Blanco y col., 2005 en España, expresa que la edad de la oveja influye en forma notable la producción de leche, observando producciones más elevadas a partir de los 4 años de edad hasta los 7 años.

La mayor producción en animales adultos está dada por el aumento de peso y el mayor desarrollo de la glándula mamaria con las preñeces sucesivas, éste es un factor que se conoce y se ha estudiado ya hace tiempo (Según Smith, 1962).

Días de ordeño	Grasa (%)	Proteína (%)	Lactosa (%)	RC (miles/ml)
13	5,23	5,57	4,87	283
27	5,48	5,61	5,16	245
48	5,76	5,79	5,26	132
75	5,76	5,65	5,26	197
103	6,74	5,31	5	157

A partir de las muestras obtenidas del tanque de frío en distintos momentos del periodo de ordeño se puede observar la variación de sus componentes. El porcentaje de grasa aumenta hacia el final del periodo de ordeño, siendo éste al inicio 5,23% y al final 6,74%. En cambio no se pudo apreciar diferencia en los valores de lactosa y proteína a lo largo del ordeño.

En cuanto al RCS se ve que al inicio es mayor, disminuyendo hacia la mitad del periodo de ordeño, elevándose luego hacia el final del mismo debido a que disminuye la producción de leche y por lo tanto no hay efecto dilución.

De acuerdo con la bibliografía, Buseti, 2007, en referencia a la calidad de leche ovina, expresa que un RCS alto se manifiesta en los componentes de la leche, con disminución de la concentración de grasa, proteínas y sólidos totales.

Las proteínas, grasa y lactosa tienen variaciones a lo largo de la lactancia, siendo mayor al inicio, para luego ir descendiendo, llegando al mínimo de su valor al mismo momento que se da el pico de producción (2-3 semanas) en una curva normal (Velasco y col., 2001), estos resultados no se evidenciaron así en el presente estudio, porque el ganado ovino presenta ante otras especies la particularidad de que la lactancia natural del cordero es más prolongada, lo que condiciona notablemente la propia curva de lactación, diferenciada por dos períodos, lactancia y ordeño, separados por el destete (Lurueña, 2010).

Tabla IV. Medias y desvío estandar del recuento celular-Rc(miles de células/ml y logaritmos en base 10) a lo largo del periodo de ordeño, con un régimen de 1 o 2 ordeños diarios, en borregas y ovejas.

Días de ordeño		13	27	48	75	102
Totales	Rc (x±s)	295,30±570,10	165,46±142,13	138,26±135,15	88,26±109,11	104,27±144,46
	log (x±s)	5,26±0,34	5,12±0,25	5,03±0,27	4,83±0,26	4,90±0,25
	n	35	67	69	69	69
Frecuencia de ordeño	1 ordeño					
	RC(miles/ml)	359,33±797,31	159,21±144,87	101,02±56,48	90,55±137,10	82,55±41,62
	(log RC)	5,23±0,40	5,11±0,25	4,95±0,20	4,81±0,27	4,87±0,18
	n	18	33	34	34	34
	2 ordeños					
	RC(miles/ml)	238,27±163,01	171,52±141,33	174,42±175,22	86,02±74,52	125,37±197,81
(log RC)	5,30±0,25	5,14±0,26	5,11±0,30	4,84±0,25	4,92±0,30	
n	18	34	35	35	35	
P>F	*	*	*	*	*	
Edad	Borregas					
	RC (miles/ml)	159,00±71,88	129,13±37,38	94,20±41,16	69,93±39,77	104,73±115,77
	log RC	5,15±0,21	5,09±0,12	4,93±0,18	4,78±0,22	4,89±0,29
	n	8	15	15	15	15
	Adultas					
	RC (miles/ml)	334,25±642,28	175,94±158,93	150,50±149,28	93,35±121,39	104,14±152,43
log RC	5,29±0,36	5,13±0,28	5,06±0,28	4,84±0,27	4,90±0,25	
n	28	52	54	54	54	
P>F	*	*	*	*	*	

*indica diferencias significativas (P<0.05) para los efectos de edad y frecuencia de ordeño.

En la tabla IV se presentan los resultados del RCS a lo largo del periodo de ordeño las cuales fueron tomadas individualmente y enviadas al laboratorio para ser procesadas mediante el método de citometría de flujo. Se observan cambios significativos en el RCS a lo largo del período de ordeño. Al inicio se observa un mayor RCS, luego disminuye en mitad del ordeño y hay un leve aumento hacia el final de la mismo.

En cuanto a la relación de la supresión de un ordeño diario y el RCS, se ve un aumento del RCS al realizar dos ordeños diarios. El aumento de células somáticas en la leche puede deberse, además de a infecciones mamarias, a factores fisiológicos (estado de lactación, parto, celo y número de crías) y no fisiológicos (Castillo, 2008; Acero, 2002). Según Marguet y col., 2000 el número de células somáticas se eleva por la injuria del ordeño mecánico y el no amamantamiento de los corderos.

Según la edad el RCS es mayor al inicio del ordeño en ovejas adultas que en borregas, sin embargo en el transcurso del ordeño no se ven diferencias entre borregas y ovejas adultas. Suárez, 2007 también encuentra diferencias en el RCS, aumentando al inicio de la lactancia, descendiendo en el pico de mayor producción, entre la tercera y quinta semana de la lactancia. Esto puede deberse a que hay una mayor prevalencia de infección en ovejas postparto, indicando que éstas son más susceptibles a padecer mastitis subclínica. Sin embargo, estos animales tienen una mayor capacidad para limitar las infecciones durante el período perinatal, para eliminar las infecciones durante la lactancia y cuantitativamente para limitar el proceso inflamatorio y sus consecuencias clínicas, esto puede deberse a la resistencia desarrollada (Rupp y col., 2009).

En una revisión realizada por Acero, 2002 expresa que uno de los factores importantes en las variaciones de RCS es la etapa de lactancia, observándose en la

última fase de lactación mayores RCS, al igual que lo reportado por Marguet y col., 2000 en su estudio con ovejas Texel y Frisona y sus cruza.

Acero, 2002 indica que existen otros factores importantes que influyen en la variación de RCS que son el sistema de ordeño, la rutina de ordeño, alimentación, ambiente, siendo los factores más importantes, la mastitis y la producción de leche.

Tabla V. Logaritmos y RCS (10^3 cel/ml), medias y desvío estándar de recuento celular al inicio y fin del ordeño según edad y frecuencia de ordeño.

	Inicio de ordeño		Fin de ordeño		P>F
	1 ordeño	2 ordeños	1 ordeño	2 ordeños	
	n	n	n	n	
Frecuencia	32	34	34	34	NS
	219,15±149,61	187,95±115,73	207,55±98,74	173,63±79,33	
	5,24±0,30	5,22±0,20	5,26±0,22	5,20±0,17	
	Borregas		Adultas		
Edad	15	51	53	53	NS
	209,70±149,33	201,13±129,53	158,53±75,42	199,66±92,98	
	5,23±0,27	5,22±0,24	5,15±0,21	5,25±0,19	

NS. No significativo

En la Tabla V se muestran los resultados del RCS al inicio y final del ordeño según frecuencia de ordeño y edad. Las mismas fueron tomadas en dos oportunidades diferentes a la de los controles lecheros. Estas fueron procesadas por el método de Breed.

Se puede observar que no hay cambios significativos al inicio y final del ordeño en RCS con respecto a la frecuencia de ordeño y la edad, en ovejas adultas de más de una lactancia y borregas de primera lactancia. Sin embargo, en un estudio realizado por Marguet y col., 2000 encontraron que en la mitad y final del ordeño se ve un aumento RCS por encima del límite normal (200×10^3 células/ml), atribuyéndose este aumento al ordeño mecánico y sin amamantamiento de los corderos. En nuestro estudio tomamos como límite máximo el establecido por Marguet y col., 2000, aunque no se ha podido fijar para los ovinos parámetros uniformes o comparables de RCS, ya que existen diferentes criterios según los autores, los que establecen parámetros desde 200×10^3 RCS/ml hasta 1×10^6 RCS/ml en razas Corriedale y Texel (Pradieé y col., 2012).

Tabla VI. Medias y desvío estándar de RCS (células $\times 10^3$) y logaritmo en base 10 según grados de CMT

CMT	n	RCS $x \pm s$	Log $x \pm s$
1	26	200,53±150,55	5,20±0,28
2	210	191,52±138,80	5,18±0,29
3	32	235,87±142,08	5,30±0,23
4	2	243,00±46,66	5,38±0,08
P>F			NS

NS. No significativo

En la Tabla VI se expresa el grado de CMT y su relación con el RCS donde se observa que a medida que aumentan los grados de CMT se ve un incremento de RCS, aunque la variación no fue significativa. A diferencia de lo que refleja el estudio realizado por González-Rodríguez, 1995 con tres razas diferentes (Assaf, Churra y Castellana), donde se ve claramente un aumento de RCS por cada grado de CMT independientemente de la raza. Sin embargo, en un estudio realizado por Pradieé y col., 2012 en ovejas Corriedale y Texel en la región de Capão do Leão, Brasil, obtienen resultados similares a los del presente estudio, donde los grados de CMT y RCS no están relacionados y su aplicación es limitada, recomendando para confirmación de mastitis el diagnóstico bacteriológico. Para dichos autores el CMT presenta baja sensibilidad en comparación con el aislamiento bacteriano, a su vez existe un número alto de reacciones falsas negativas y positivas.

Comparando con el estudio realizado por Marguet y col., 2000 donde se utilizan razas Texel y Frisona y su cruce, en el cual se establecen como límite máximo para leche ovina normal 200×10^3 células/ml. En el presente estudio es posible observar que el grado 1 y 2 de CMT se encuentran dentro del valor normal de RCS y los grados 3 y 4 superan este máximo, lo que indicaría que no es una leche normal. No obstante en el presente estudio no se obtuvieron RCS altos ya que no superan las 250×10^3 células/ml.

Tabla VII: Microorganismos aislados de muestras individuales con mayor grado de CMT

CMT	Nº totales	Nº sembradas	Positivos al Cultivo	Microorganismo
4	2	2	Ninguno	Ninguno
3	32	32	4	SCN*, <i>St. agalactiae</i> *, <i>E. coli</i> *, <i>Staphylococcus aureus</i> *, SCP, <i>Enterococcus</i> spp
2	215	16	3	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus</i> spp

*Microorganismos aislados de una misma muestra.

Las muestras que se aislaron, presentaron grado 2 y 3 de CMT. Las muestras con grado 4 no dieron positivo al aislamiento microbiano, esto puede deberse a que el CMT es un método que presenta un número alto de reacciones falsas negativas y positivas, como quedo demostrado por Pradieé y col, 2012.

Según Las Heras y col., 1998, existen coeficientes de correlación significativos entre las variables: la producción de DNAsa y actividad hemolítica de *Staphylococcus aureus* con el CMT; los recuentos bacterianos en leche con el carácter hemolítico y la producción de DNAsa. Estos hallazgos sugieren que los aislamientos con hemólisis positiva y DNAsa positiva se corresponderían con reacciones más intensas al CMT. En nuestro estudio los grados 2 y 3 de CMT dieron reacción positiva a DNAsa y a la formación de hemólisis.

Tabla VIII: Microorganismos aislados según muestras sembradas al inicio y fin del período de ordeño.

Microorganismos aislados	Nº de muestras
<i>Staphylococcus aureus</i> *	4
SCN*	2
<i>Enterococcus</i> spp.	2
SCP	1
<i>Streptococcus agalactiae</i> *	1
<i>E. coli</i> *	1

*Bacterias aisladas de una misma muestra.

Los agentes etiológicos mayormente aislados fueron *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulasa negativa* y *Enterococcus* spp. y en menor proporción SCP, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*.

Si tomamos al grupo *Staphylococcus coagulasa positiva*, podríamos observar que nuestros resultados son comparables a los obtenidos por Apolo y col., 1998, realizado en leche ovina de cruce Corriedale y Milchschaf, que fue en un 46%. Mientras que *Staphylococcus coagulasa negativa* 18%, *Streptococcus* spp. 18%, *Corynebacterium* spp. 12%, *E. coli* 6%.

Suárez y col., 2002 con ovejas Pampinta, encontraron *Staphylococcus coagulasa negativa* un 32,4 %, *Micrococcus* spp un 32,4%, *Corynebacterium* spp un 5,4% y *Bacillus* un 1,4%, los que fueron los agentes más frecuentemente aislados (prevalentes), mientras *Staphylococcus aureus* 27% y *Escherichia coli* 1,4% fueron el grupo menos aislado.

CONCLUSIONES

En el presente estudio no se obtuvieron RCS elevados ya que el máximo fue de 300.000 cél/ml.

La mayor variación del RCS entre la población, se presentó al inicio del período de ordeño, con un ordeño diario y en ovejas adultas.

Existe una variación del RCS a lo largo del período de ordeño, esto indica que el periodo de ordeño influye en el RCS.

En ovejas adultas se da un aumento del RCS al inicio del periodo de ordeño, en cambio en borregas es menor en esta etapa.

En cuanto al nivel productivo, la supresión de un ordeño diario lleva a una disminución de la producción. Ovejas adultas producen más litros de leche a los 100 días de lactancia que las borregas de primer ordeño.

En cuanto al CMT aplicado en ovinos se puede observar que es una prueba poco sensible, ya que los grados altos de este no coinciden con recuentos celulares elevados.

El CMT no es un buen método para el diagnóstico de mastitis subclínica en ovinos.

Los agentes etiológicos principalmente aislados fueron *Staphylococcus* coagulasa positiva, *Enterococcus* spp. y *Staphylococcus* coagulasa negativa y con menor frecuencia fueron aislados *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*. En ninguno de los casos se observó cambios en la composición de la leche ni de la glándula mamaria.

Los resultados del aislamiento no son realmente representativos de la población con mastitis subclínica, ya que se sembraron las muestras a partir de los grados más altos de CMT y este método no es confiable para el uso en ovinos por no tener una buena sensibilidad. Posiblemente el mejor método para determinar mastitis subclínica en ovinos sea el RCS.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Acero, P. (2002) Producción y calidad de leche de oveja en rebaños de Castilla y León. Universidad Valladolid. Disponible en:http://www.marm.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_Ganad/Ganad_2002_16_28_32.pdf. Fecha de consulta: 6 de Junio de 2011.
- 2 Albenzio, M; Taibi, L; Muscio, A; Sevi, A (2001) Prevalence and etiology of subclinical mastitis in intensively managed flocks and related changes in the yield and quality of ewe milk, Italia. *Small Ruminant Research*. 43:219-226.
- 3 Al-Majali Ahmad, M; Jawabreh, Sami (2002) Period prevalence and etiology of subclinical mastitis in Awassi sheep in southern Jordan. *Jordania. Small Ruminant Research*. 47:243-248.
- 4 Apolo, A; Bellizi, T; de Lima, D; Burgueño, M. (1998) Subclinical mastitis. Dairy sheep en Uruguay. *Proc. Sixth International Symposium on the Milking of Small Ruminants, Athens, Greece, Sep 26-Oct 1*. p.168-169.
- 5 Bacteriological Analytical Manual (2001) Blood Agar Base (Infusion Agar). Bacteriological Analytical Manual 8^o ed. Disponible en: www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualB. Fecha de consulta: 10 de Junio de 2013.
- 6 Bacteriological Analytical Manual (2001) Cetrinide Agar in Bacteriological Analytical Manual, 8^o ed. Disponible en: www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/UCM064566. Fecha de consulta: 17 de Mayo de 2011.
- 7 Barberis, S; Aguiar, E; Molins, M; Draksler, D; González, S; Núñez, M; Oliver, G; Pita Martín, M. L; Ronayne, P. (2002) *Bromatología de la Leche*. Buenos Aires. Hemisferio Sur. 230 p.
- 8 BD (2009) Cetrinide agar. Disponible en: <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8794>. Fecha de consulta: 20 de agosto/ de 2013.
- 9 Bergonier, D; Berthelot, X. (2003) New advances in epizootiology and control of ewe mastitis. *Livestock Production Science*. 79: 1–16.
- 10 Boyazoglu, J.G.. (1980) Note sur l'adaptation de la brebis de Frise orientale et de ses croisements en Méditerranée (A note about the adaptation of the West Friesian sheep and their crosses en the Mediterranean). *Bulletin de l'Academie Veterinaire de France*. 53: 259–264.
- 11 Bouman, M (2010) Producir leche de bajos recuentos de células es muy rentable. Disponible en: http://www.planagropecuario.org.uy/publicaciones/revista/R91/R91_34.htm. Fecha de consulta: 20 de agosto de 2013.

- 12 Brizuela, M (2007) Estreptococo agalactiae Grupo B (EGB). Patógeno emergente de infección grave en neonatos y niños. Disponible en: www.revistabioanálisis.com/arxius/notas/Nota2_13.pdf. Fecha de consulta: 19 de agosto de 2013.
- 13 Busetti, M (2007) La Calidad en la Leche de Oveja. INTA Anguil. Disponible en: <http://www.produccion-animal.com.ar/> . Fecha de consulta: 12 de Junio de 2013.
- 14 Busetti, M (2000) Composición de la leche en ovejas Pampinta a lo largo de un periodo de lactación. INTA Anguil. Disponible en: <http://www.produccion-animal.com.ar/> . Fecha de consulta: 12 de Junio de 2013.
- 15 Calvino, L.F. Diagnostico bacteriológico de mastitis y su importancia en los programas de control. Disponible en: http://www.aprocal.com.ar/wp-content/uploads/diagnostico_de_mastitis.htm.pdf. Fecha de consulta: 19 de agosto de 2013
- 16 Castillo, V. (2008) Evaluación de diferentes estrategias de ordeño en ovejas lecheras de raza Manchega y Lacaune: efectos de la disminución de la frecuencia de ordeño sobre la secreción y el almacenamiento de la leche en la ubre. Universitat Autònoma de Barcelona. Disponible en: www.tdx.cat/handle/10803/5698. Fecha de consulta: 24 de Junio de 2011.
- 17 De Lima, D; Reginensi, S (2005) Leche y productos lácteos: aspectos moleculares y tecnológicos. Montevideo. Gega 96p
- 18 Demeter, K.J (1969) Lacto-Bacteriología .Zaragoza. Acribia. 350 p.
- 19 Echeverri, J; Jamarillo, M; Restrepo, L (2010) Evaluación comparativa de dos metodologías de diagnóstico de mastitis en un hato lechero del Departamento de Antioquia. Revista Lasallista de Investigación. 7(1): 49-57.
- 20 Facultad de Ciencias Veterinarias- Universidad Nacional del Nordeste. Producción de Pequeños Rumiantes y Cerdos. Producción ovina. Argentina. Disponible en: <http://ppryc.files.wordpress.com/2011/04/ut1-ovinos-u1.pdf>. Fecha de consulta: 3 de Julio de 2013.
- 21 Farid, A. H; Fahmy, M. H. (1996) The East Friesian and other European breeds. Disponible en: <http://216.46.11.100/igcs/PDF-BOOK%20CHAPTERS/B-08-%20EF%20and%20European%20breeds.pdf>. Fecha de consulta: 14 de Junio de 2013.
- 22 Feng, P; Weagant, S. D; Grant, M. A. (2002). Enumeration of Escherichia coli and The Coliform Bacteria. Bacteriological Analytical Manual, 8º ed. Disponible en: www.fda.gov/food/scienceresearch/LaboratoMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm064948.htm. Fecha de consulta: 4 de Marzo de 2011.

- 23 Ferreira, C. G. (2004) Produção e Composição Química do Leite em Diferentes Genótipos Ovinos. Tesis. Universidad Federal de Pelotas-Brasil. 51. p.
- 24 Food and Agriculture Organization (2011) Situación de la lechería en América Latina y El Caribe en 2011. Disponible en: http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Dairy/Documents/Paper_Lecher%C3%ADa_AmLatina_2011.pdf. Fecha de consulta 3 de Julio de 2013.
- 25 González, C; Micheo, C; Amand de Mendieta, V; Soriano, C; Zeballos, H. (2002) Prevalencia de mastitis subclínica y calidad higiénico sanitaria de la leche en tres tambos de ovinos. *Revista Medicina Veterinaria*. 83(4): 148-150.
- 26 Gonzalez-Rodriguez, M.C; Cármenes, P. (1995) Evaluation of the California Mastitis test as a discriminant method to detect subclinical mastitis in ewes. *Small Ruminant Research*. 21: 245-250.
- 27 Haenlein George, F.W. (2002) Relationship of somatic cell count in goat milk to mastitis and productivity. *Small Ruminant Research*. 45:163-178.
- 28 Hervás, G; Ramella, J. L; López, S; González, J. S; Lavín, P; Mantecón, A. R (2006) Pautas alternativas de ordeño: Supresión de 1 o 2 ordeños semanales en ganado ovino. *Mundo Ganadero*. 189: 44-49.
- 29 Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (2012) Queso Cerrillano. Disponible en: <http://www.inia.org.uy/online/site/46618611.php>. Fecha de consulta: 20 de agosto de 2013.
- 30 International Committee For Animal Recording (ICAR). (2007) International agreement of recording practices. General Assembly, Finland on 9 June 2006, p.63-65. Disponible en: http://www.mattilsynet.no/mattilsynet/multimedia/archive/00040/ICAR_40944a.pdf. Fecha de consulta: 17 de Setiembre de 2010.
- 31 Jefferies, B.C. (1961). Body condition scoring and its use in management. *Tasmanian Journal of Agriculture*. 32: 19-32.
- 32 Kremer, R. (2004). Departamento de Ovinos, Lanas y Caprinos. Curso de Lechería Ovina, Ciclo orientado Producción Animal. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República, Facultad de Veterinaria, CD ROM.
- 33 Kremer, R; Barbato G; Rista, L; Rosés, L; Perdígón, F. (2010) Reproduction rate, milk and wool production of Corriedale and East Friesian×Corriedale F1 ewes grazing on natural pastures. *Small Ruminant Research*, 90: 27–33.
- 34 Kremer, R; Barbato, G; Rosés, L; Rista, L. (2003) Dairy milk yield of East Friesian and Corriedale sheep *Proceedings IX World Conference on Animal Production*, Porto Alegre, RS, Brasil. 91 p.

- 35 Kremer, R; Barbato, G; Rosés, L; Rista, L. (2009) Productividad del Corriedale y cruza Milchschaaf con ordeño mecánico en un sistema ovino en pastoreo. Disponible en: <http://www.ovinos-caprinos.com.ar/MANEJO/Productividad%20del%20Corriedale%20y%20cruzas%20Milchschaaf%20en%20Leche.pdf>. Fecha de consulta: 24 de Junio de 2013.
- 36 Kremer, R; Barbato G; Rista, L; Rosés, L; Perdigón, F; Herrera, V. (1996) Machine milk yield and composition of non dairy Corriedale sheep in Uruguay. *Small Ruminant Research* 19: 9-14
- 37 Larrosa Borean, J.R; Kremer, R. (1990) Leche ovina y caprina. Una nueva alternativa agroindustrial. Montevideo, Hemisferio Sur.172 p.
- 38 Las Heras, A; Fernández-Garayzábal, J.F; Legaz, E; López, I; Domínguez, L. (1998) Importance of subclinical mastitis en milking sheep and diversity of aetiological agents. *Proc. Sixth International Symposium on the Milking of Small Ruminants, Athens, Greece, Sep 26-Oct 1.* p. 137-141.
- 39 Legarra, A; Ugarte, E. (2005) Genetic Parameters of Udder Traits, Somatic Cell Score, and Milk Yield in Latxa Sheep. *Journal of Dairy Science.* 88: 2238-2245.
- 40 Leitner, G; Nissim, S; Uzi, M. (2007) Estimate of milk and curd yield loss of sheep and goats with intramammary infection and its relation to somatic cell count. *Small Ruminant Research* 74: 221-225.
- 41 Lurueña, M. M. A (2010) Efecto de la raza y del recuento de células somáticas sobre la calidad del queso de oveja. Salamanca. Escuela Politecnica Superior de Zamora, Universidad de Salamanca. Tesis Doctoral. 454p.
- 42 Marguet, E.R; Vilanova, C.P; Salgado, E. (2000) Estudio de mastitis subclínicas en un rodeo ovino lechero. *Veterinaria Argentina.* 17 (163):190-197.
- 43 Mcd LAB (2010) Base de agar sangre. Disponible en: http://www.mcd.com.mx/pdfs/base_agar_sangre.pdf. Fecha de consulta: 20 de agosto de 2013.
- 44 McDougall, S; Pankey, W; Delaney, C; Barlow, J. Murdough, P; Scruton, D (2002) Prevalence and incidence of subclinical mastitis in goats and dairy ewes in Vermont, USA. *Estados Unidos. Small Ruminant Research.* 46:115-121.
- 45 Menzies, PI; Ramanoon, SZ. (2001) Mastitis of sheep and goats. *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice* 17(2): 333-358.
- 46 Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Dirección de Estadísticas Agropecuarias Disponible en:

<http://www.mgap.gub.uy/Dieaanterior/Anuario2011/DIEA-Anuario-2011-web.pdf>. Fecha de consulta: 3 de Julio de 2013.

- 47 Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (2011) Manual para la Habilitación y Refrendación de Establecimientos Productores de Leche y Queserías Artesanales. Montevideo, MGAP, 33 p.
- 48 Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (2011) Dirección General de Servicios Ganaderos, Resolución N° 27/011. Disponible en: www.mgap.gub.uy/DGSG. Fecha de consulta: 3 de Julio de 2013.
- 49 Ministerio de Agricultura del Gobierno de Chile (2008) Producción de Leche y Queso de Oveja Latxa. Chile. Disponible en: http://www.indap.gob.cl/sites/default/files/produccion_de_leche_y_queso.pdf. Fecha consulta: 3 de Julio de 2013.
- 50 Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (2004) Decreto 164/004 de 12 de mayo de 2004. Disponible en: <http://www.presidencia.gub.uy/decretos/2004051205.htm>. Fecha de consulta: 8 de Junio de 2011.
- 51 Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (2004) Decreto 274/004. Disponible en: http://www.mgap.gub.uy/DGSG/Resoluciones/Res_27_011_Manuales_habilitaci%C3%B3n_refrendaci%C3%B3n_leche_artesanal/I_Manual%20habilitaci%C3%B3n%20y%20refrendaci%C3%B3n%20tambos%20y%20queser%C3%ADas%20artesanales_v01m.pdf. Fecha de consulta: 8 de Junio de 2011.
- 52 Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (2003) Decreto 65/003. Disponible en: <http://www.presidencia.gub.uy/decretos/2003021703.htm>. Fecha de consulta: 8 de Junio de 2011.
- 53 Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (1994) Decreto N° 315/994 de fecha 05/07/1994. Disponible en: http://www.ruandi.org.uy/quehacemos_presentaciones/reglamento_bromatologico_decreto315_1994.pdf. Fecha de consulta: 8 de Junio de 2011.
- 54 Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (1997) Decreto 2/997 de 3 enero de 1997. Disponible en: http://www.mgap.gub.uy/DGSG/Resoluciones/Res_27_011_Manuales_habilitaci%C3%B3n_refrendaci%C3%B3n_leche_artesanal/I_Manual%20habilitaci%C3%B3n%20y%20refrendaci%C3%B3n%20tambos%20y%20queser%C3%ADas%20artesanales_v01m.pdf. Fecha de consulta: 8 de Junio de 2011.
- 55 Moroni, P; Cuccuru, C; Bronzo, V; Manunta, L; Contini, A; Zecconi, A (1998) Phagocytic activity of polymorphonuclear neutrophils in ewe's milk in dairy sheep in Uruguay. Proc. Sixth International Symposium on the Milking of Small Ruminants, Athens, Greece, Sep 26-Oct 1. p. 113-118.
- 56 Navarro, C. S (2009) Los estafilococos coagulasa negativa están suscitando en la actualidad un interés creciente, ya que su implicación en casos de

- mastitis cada vez reviste más importancia. Disponible en: <http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/7750/ARTICULOS-RUMIANTES-ARCHIVO/Mastitis-bovina-causada-por-ECN.html>. Fecha de consulta: 20 de agosto de 2013.
- 57 Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2011) Disponible en: <http://www.fao.org/economic/ess/ess-home/es/#.Ud1qR9j-qno>. Fecha de consulta: 10 de julio de 2013.
- 58 Oxoid Medio Edwards Disponible en: http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0027&org=137&c=UK&lang=EN. Fecha de consulta: 19 de agosto de 2013.
- 59 Parlamento Europeo, Reglamento N°853/2004. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0055:0205:ES:PDF>. Fecha de consulta: 3 de Julio de 2013.
- 60 Parra Trujillo, M. H; Peláez, S. L; Londoño, A. J. E; Pérez, A. N; Rengifo, B. G (2003) Los residuos de medicamentos en la leche, problemáticas y estrategias para su control. Disponible en: http://agronet.gov.co/www/docs_si2/20061024154510_control%20estrategico%20residuos%20medicamentos%20en%20la%20leche.pdf. Fecha de consulta: 20 de agosto de 2013.
- 61 Peña Blanco, F; García Martínez, A; Martos Peinado, J (2005) Revisión bibliográfica sobre producción de leche, control lechero y curvas de lactación, Madrid, Dpto Prod. Animal, Univesidad de Córdoba. Disponible en: http://www.uco.es/zootecniaygestion/img/datos/02_15_10_CLACTACION.pdf. Fecha de consulta: 24 de Junio de 2013.
- 62 Pinto, C. M; Vega León, S; Pérez Flores, N (1998) Métodos de análisis de la leche y derivados –Garantía de calidad. Valdivia, Universal Austral de Chile. 489 p.
- 63 Pouch Downes, F; Ito K (2001) Compendium of Methods for the Microbiological examination of foods, 4a.ed. Washington. APHA, 676p.
- 64 Pradieé, J; Moraes, C; Goncalves, M; Vilanova, M; Correa, G; Lauz, O; Osório, M; Schmidt, V (2012) Somatic cell count and California mastitis test as a diagnostic tool for subclinical mastitis in Ewes. *Acta Scientiae Veterinariae*, 40 (2).
- 65 Radostits, O.M; Gay, C.C; Blood, D.C; Hinchcliff, K.W. (2001) *Medicina Veterinaria, Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino*. Madrid. Mc Graw Hill. Vol I. 1206 p.
- 66 Rupp, R; Bergonier, D; Dion, S; Hygonenq, M. C; Aurel, M. R; Robert- Granié, C; Foucras, G. (2009) Response to somatic cell count-based selection for mastitisresistance en a divergent selection experiment in sheep. *Journal of Dairy Science* 92(3): 1203-1219.

- 67 Salgado, E (2007) Efecto de uno *versus* dos ordeños diarios sobre la producción y composición de leche de ovejas de raza Assaf Española. Tesis. Universidad de León. 20 p.
- 68 Santibáñez, A; Such, X; Caja, G; Castillo, V; Albanell, E (2009) Efecto de la práctica de un ordeño *versus* dos ordeños sobre la producción, composición de la leche y capacidad cisternal en ovejas Manchega y Lacaune durante la lactación. Facultad de Veterinaria. Universitat Autònoma de Barcelona. p. 422-426.
- 69 Schällibaum, M (1995) Counting somatic cells in milk, International IDF standard 148:1991 approved as a final standard (1994) .Newsletters of the International Dairy Federation.142:2-35.
- 70 Smith.V (1962) Fisiología de la lactancia. Turrialba, SIC. 282 p.
- 71 Sosa, N. de C; Feder, A. (1971) Análisis y Control de la leche y derivados. Montevideo. Universidad de la República, Facultad de Veterinaria. 197 p.
- 72 Stanchi, N. O; Martino, P. E; Gentilini, E; Reinoso, E. H; Echeverria, M. G; Leardini, N. A; Copes, J. A (2010) Microbiología veterinaria. Buenos Aires. Inter-Medica S.A.I.C.I. 594p.
- 73 Stefanakis, A; Boscos, C; Alexopoulos, C; Samartzi, F. (1995) Frequency of subclinical mastitis and observations on somatic cell counts in ewes' milk in northern Greece. Animal Science 61: 69-76.
- 74 Suarez, V. H (2007) Mastitis en ovejas lecheras. Idia XXI: revista de información sobre investigación y desarrollo agropecuario. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria [INTA] 7: 186-190.
- 75 Suarez, V. H; Buseti, M. R; Miranda, A. O; Calvino, L. F; Bedotti, D. O; Canavesio, V. R. (2002) Effect of Infectious Status and Parity on Somatic Cell Count and California Mastitis Test en Pampinta Dairy Ewes. Journal of Veterinary Medical Science B 49: 230–234.
- 76 Suárez, V, H; Buseti, M (2006) Lechería ovina en Argentina. INTA. Div. Técn. 90. Disponible en: <http://www.produccion-animal.com.ar/>. Fecha de consulta: 16 de Junio de 2013.
- 77 Suárez, V. H; Buseti, M; Felice, M. (2007) Factibilidad Económica de la Lechería Ovina en Vº Congreso de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos, Mendoza, Argentina, INTA. Disponible en: <http://www.produccion-animal.com.ar/>. Fecha de consulta: Junio de 2013.
- 78 Suárez, V. (2004). Lechería Ovina y Raza Pampinta. La Pampa. INTA Anguil. Disponible en: <http://www.produccion-animal.com.ar/>. Fecha de consulta: 16 de Junio/2013.
- 79 Torres, C. A (2010) Etiología de la mastitis ovina. Disponible en: <http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/jspui/bitstream/123456789/324/1/E>

TIOLOGIADELAMASTITISOVINA.pdf. Fecha de consulta. 20 de agosto/2013.

- 80 Ugarte, E; Ruiz, R; Gabiña, D; Beltrán de Heredia, I (2001) Impact of highyielding foreign breeds on the Spanish dairy sheep industry. *Livestock Production Science*. 71: 3–10.
- 81 Velasco, S; Cañeque, V; Díaz, N.T; Pérez, C; Lauzurica, S; Huidobro, F; Manzanares, C; González, J (2001) Producción lechera y composición lipídica de la leche de ovejas Talaveranas durante el periodo de lactancia. Madrid, España. *Investigación Agraria, Producción y Sanidad Animal*. 16(1): 181-192.
- 82 Walstra, P; Geurts, T.J; Noomen, A; Jellema, A; van Boekel, M.A.J.S (2001) *Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos*. Zaragoza. ACRIBIA 715p.
- 83 Zárate, M.S; Vargas, L. J; Pacheco, M.V; Canigia, L. F; Smayevsk, J. (2005) Modified Spot CAMP Test: A rapid, inexpensive and accurate method for identification of group B streptococci. *Revista Argentina de Microbiología* 37: 126-128.