

Cátedra de:
TECNOLOGIA DE LA LECHE.

GUIA TRABAJO PRACTICO N° 4 – 2007.

CITOLOGIA DE LA LECHE

Introducción:

Como todas las secreciones de los organismos vivos, la leche también tienen células somáticas y su número por mililitro es un importante parámetro para diagnosticar el nivel de mastitis de un rodeo lechero.

Es recomendable tener un recuento mensual de células somáticas de la **leche total del tambo** para poder evaluar el estado sanitario de las ubres del rodeo lechero.

Como objetivo debería fijarse un recuento de células somáticas de la leche total del tambo menor a 200.000. Si los recuentos aumentan deberán hacerse análisis complementarios para determinar la causa de ese aumento e implementar las medidas preventivas correspondientes.

La Federación Internacional de Lechería (FIL), en 1997 fijó para la leche normal un recuento de hasta 250.000 células somáticas por ml de leche.

No debe confundirse lo que establece la FIL como parámetro de calidad para la leche normal y el número de células somáticas aconsejable para manejar el control de la mastitis en un rodeo.

Origen de las células somáticas.

Epitelio glandulares: son células cúbicas y provienen de los alvéolos y conductos excretores de menor calibre. Como es un epitelio muy activo en la síntesis de la leche, es lógico suponer que en la leche normal el mayor porcentaje pertenece a ese tejido.

Su tamaño es de 10 – 13 micras y su núcleo tiene forma oval y un color más claro que el de las células sanguíneas con la coloración de Papanheim.

Epitelio cilíndrico: provienen de los conductos galactóforos mayores y de las cisternas de la ubre y del pezón. Por su forma y su tamaño se parecen a las células cúbicas, pero su presencia en la leche es escasa

Epitelio plano: o pavimentoso provienen del canal del pezón y de la piel del pezón. Son células grandes de hasta 55 micras con un núcleo pequeño de 6 – 7 micras que generalmente falta debido al proceso de cornificación. Estas células también son llamadas “cornificadas”, “pellejos” o “películas”.

Otras células: Pueden encontrarse también en un extendido de leche restos de núcleos y fragmentos protoplasmáticos que reciben el nombre de corúsculos de Nissen.

Pueden encontrarse células de Langhans que aparecen en las mastitis tuberculosas y brucelósicas. Miden unas 40 micras y presentan de 20 – 25 núcleos que forman una guirnalda abierta hacia un lado.

El en calostro o en la leche calostrada se encuentran los “corpúsculos calostrales” o “células de calostro”, que son células repletas de glóbulos grasos. Su origen no es

claro. La hipótesis en favor de que son células glandulares se debe a que en su citoplasma no se encuentran los clásicos gránulos de los granulocitos.

La bibliografía menciona que se encuentran células epiteliales (llamados por algunos autores “células espumosas”) y monocitos con infiltraciones de grasa. De manera que el origen de los corpúsculos calostrales probablemente sean células epiteliales y monocitos.

Células sanguíneas:

Eritrocitos: o glóbulos rojos. Miden de 5 – 6 micras y no tienen núcleo. Su presencia en leche normal es muy rara. Pueden estar presentes en el calostro o en los procesos patológicos.

Leucocitos: neutrófilos, basófilos y eosinófilos: llamados también granulocitos porque con la tinción de la peroxidasa aparecen granulaciones en su citoplasma las cuales dan origen a su nombre. Tienen una vida media de 8 a 10 días.

Neutrófilos: debido al polimorfismo de su núcleo se los llama polimorfonucleares (PMN). Miden de 10 – 15 micras. Tienen movimientos amiboides lo que les permite abandonar los vasos sanguíneos mediante el proceso llamado diapédesis obedeciendo a mensajeros químicos que son liberados por los tejidos lesionados y acudir en su defensa. Son llamados por ello “primera línea de defensa”. Son llamados también “microfagos” porque tienen la capacidad de fagocitar pequeñas partículas como bacterias y hongos.

A pesar de perder eficiencia en la leche por fagocitar pequeños glóbulos de grasa y micelas de caseína, cumplen un importante rol de defensa. En los procesos patológicos pueden representar el 95% del total de las células presentes en la leche.

Eosinófilos: miden de 14 – 20 micras. Su núcleo es semejante al de una herradura o un trébol. Es muy rara su presencia en leche normal.

Basófilos: miden de 10 – 18 micras. Pueden encontrarse en leche normal, pero en muy escasas proporciones.

Linfocitos: miden de 6 – 10 micras. Su núcleo es redondo y se colorea de azul oscuro. Su presencia es común en leche normal. Viven de 100 a 200 días.

Monocitos: Son células grandes de 14 – 22 micras. Son móviles capaces de fagocitar cuerpos extraños por lo cual son llamadas macrófagos. Su función es eliminar el tejido muerto de los procesos inflamatorios. Se pueden encontrar en leche normal. Su presencia está más ligada a los procesos inflamatorios crónicos.

Calostro: el número de células somáticas del calostro es elevado debido a la descamación de las células epiteliales. Las variaciones individuales aquí son muy importantes e influyen el tiempo de “secado”, el número de lactancias, etc. Si tenemos en cuenta los valores que citan los distintos autores, debemos considerar un valor de 1.500.000 células somáticas como promedio.

El calostro presenta los corpúsculos calostrales. A veces las infiltraciones de grasa son tan abundantes que no permiten visualizar el núcleo.

Leche normal: la leche normal tiene un 70% de células epiteliales, un 22% de leucocitos (eosinófilos + basófilos + neutrófilos) y un 8% de linfocitos.

Variaciones fisiológicas:

Fracción de ordeño: la leche del comienzo del ordeño tiene menos células somáticas que la leche del final. Esto se puede comprobar fácilmente con el California Mastitis Test (CMT).

Período de lactancia: en cuartos sanos en el momento en que la vaca da mas leche el recuento de células somáticas es menor (por el efecto dilución). Hacia el final de la lactancia, si bien disminuye el volumen de leche, se suma también el comienzo de la descamación debido al proceso del secado.

Número de lactancias: el número de células somáticas por ml de leche aumenta con el número de lactancia, ante todo a partir de la cuarta. Eso se puede comprobar facilmente con el CMT.

Estaciones del año: en los meses de verano, por el stress del calor, la producción de leche baja y por lo tanto aumenta el recuento de células somáticas.

Celo: en este período la vaca consume menos alimentoy sumando el nerviosismo, produce menos leche y por lo tanto aumenta también el número de células somáticas.

Alimentación: la subalimentación, dietas ricas en proteínas y con poca fibra aumentan el recuento de células somáticas.

Stress: dentro de todas las influencias fisiológicas, sin duda el stress es el que tiene mas importancia en el aumento de los recuentos de células somáticas y como fenómenos estresantes importantes podemos mencionar el calor y el exceso de lluvias.

METODOS PARA DETERMINAR EL RECUESTO DE CELULAS SOMATICAS Y MASTITIS

Hay numerosos métodos físicos, químicos instrumentales, los cuales se eligen de acuerdo al objetivo, la rapidez y al costo de los análisis. Algunos de ellos solamente aportan datos complementarios a los recuentos de células somáticas.

Métodos basados en las modificaciones físico-químicas de la leche:

- Variación del pH: . peachímetro
. azul de bromotimol
. púrpura de bromocresol
. papel indicador
- Valoración de proteínas: - Determinación de lactosa
- Determinación de cloruros
- Conductividad eléctrica (aparatos manuales que se usan al pié de la vaca y sistemas informáticos para tambos)
- Prueba del filtro DNA
- Valoración enzimática: - prueba del N-acetyl- κ -glucosaminidase(NAGASA).

Métodos basados en el agente etiológico: (mastitis)

- Identificación microscópica de los microorganismos.
- Cultivos y técnicas específica

Métodos basados en el recuento de células somáticas:

- Métodos directos: recuento microscópico según Prescott – Breed (método de referencia para los demás métodos).
- Métodos indirectos: . Prueba de Whiteside

- . California Mastitis Test (muy usado).
 - . Brabant mastitis test
 - . Wisconsin Mastitis Test
 - . Prueba de la catalasa
 - . Viscocímetro a bolita (Ruakura Rolling Ball Viscometer)
 - . Viscocímetro rotativo (Rotary Viscometer).
- Métodos instrumentales:
- . Electrónico: Coulter Counter
 - . Optico-electrónico: Optical Somatic Cell Counter System
 - . Fluorescencia: Ej. Fossomatic (Foss Electric Dinamarca).
 - . Somacount (Bendley, USA).

Muchos de lo métodos mencionados son complementarios como por ej: determinación de lactosa, proteínas, pH, etc.

Recuento de células somáticas según Prescott – Breed.

Muestra: la muestra que se obtiene debe ser representativa del total de la leche que se desea analizar (vaca, tacho, tanque, etc). Debe ser previamente homogeneizada en forma manual o automática (las células somáticas ascienden a la superficie con los glóbulos grasos!!!)

Las muestras deben ser obtenidas con material limpio. No es necesario que sean estériles si se utilizan solamente para el recuento de células. Si la muestra se utiliza para hacer análisis microbiológicos debe ser estéril.

Una vez obtenida la muestra se transporta hacia el laboratorio en una conservadora con hielo y en ese estado (refrigerada a 4°C) si es solamente para recuento de células somáticas puede conservarse durante 24 h. El agregado de conservantes com dicromato de potasio o ácido bórico, etc, mejora la conservación.

Resumen: este método se toma como **referencia** para calibrar todos los demás equipos o instrumentos para contar células somáticas. Asimismo puede ser utilizado para hacer recuentos cuando las muestras no son numerosas. Es el método mas exacto.

Se hacen dos extendidos de 0,01 ml y de 1 cm² cada uno sobre un portaobjetos limpio y desengrasado. Se seca, se desengrasa, se colorea y se hace el recuento. Se saca el promedio de células por campo microscópico contado y se lo multiplica por el factor microscópico (FM) con lo cual se obtiene el número de células somáticas por ml de leche.

Reactivos: se puede usar cualquiera de las dos soluciones.

a) Solución alcoholica de azul de metileno:

Azul de metileno 0,3 gr
 Alcohol 96° 30 ml
 Agua destilada..... 100 ml

Se mezcla el azul de metileno con los 30 ml de alcohol y se agregan los 100 ml de agua destilada. Es conveniente filtrar la solución con papel de filtro a los efectos de extraer sedimentos y sustancias extrañas que dificultan la lectura.

b) Solución Breed:

Azul de metileno 0,6 gr.

Alcohol etílico 96° 54,0 ml
Tetracloroetano 40,0 ml
Acido acético 6,0 ml

Se mezcla el alcohol etílico y el tetracloroetano en un frasco y se calienta en baño de agua a 60 –70 °C. Después de agregar el azul de metileno se mezclan bien. Seguidamente se enfría a 4°C y se agrega el ácido acético. Se filtra con un filtro plegado (de 10 – 12µm). Se guarda tapado herméticamente el frasco. Antes de usarlo, si es necesario debe filtrarse nuevamente.

Solución desengrasante y fijadora:

Alcohol 96°100 ml
Xilol 100 ml

Se mezclan en partes iguales.

Material:

- Microscopio con lente de inmersión.
- Micropipeta de 0,01 microlitros.
- Portaobjetos.
- Ansa recto.
- Guía con 2 superficies de 1 cm² cada una.
- Baño de agua de 40°C.
- Estufa de cultivo.
- Alcohol, algodón.
- Reactivos.

Técnica operatoria:

La muestra de leche se termiza a 40°C en baño de agua para poder homogeneizar la muestra. Esto se hace invirtiendo el frasco repetidamente durante 20 segundos y luego se se enfría a la temperatura de uso que indica la micropipeta (20°C).

El portaobjetos se limpia y desengrasa con alcohol y se seca con algodón o papel libre de partículas y polvo.

Extendido: se coloca el portaobjetos sobre la guía. Con la micropipeta se aspira y se sopla repetidamente la muestra de leche a los efectos de "homogeneizar" el interior de la misma (si no hacemos esto, algunas células somáticas quedarán adheridas a las paredes de la pipeta y por lo tanto el resultado será erróneo). Se aspiran luego 0,01 ml de la muestra de leche homogeneizada(se deben aspirar mas de 0,01 ml), se limpian las paredes de la pipeta con un algodón (si no lo hacemos la muestra de leche que queda adherida a la parte externa de la pipeta se mezcla con la leche que se va a analizar!), se enrasa hasta 0,01 ml colocando un algodón en el extremo de la micropipeta. Luego se depositan 0,01 ml sobre cada uno de los 2 cm² guía vaciando completamente la micropipeta. Se hace el extendido utilizando un ansa recto.

A continuación se seca sobre una superficie perfectamente horizontal. Para ello es conveniente utilizar una estufa para que el secado sea mas rápido.

Luego se fija y se desengrasa con la solución alcohol-xilol durante 5 – 10 minutos. Se deja escurrir la solución y sin lavarlo se tiñe con la solución alcoholica de azul de metileno durante 40 segundos. Se lava, se seca en estufa y se hace la lectura.

Si se utiliza la solución Breed, se sumerge durante 10 minutos el portaobjetos en la solución. Se lava se se se y se lee.

Recuento: el extendido se lee con lente de inmersión (aceite de cedro).

De cada uno de los dos extendidos de un cm² que vamos a tener en un portaobjetos, se cuentan entre 20 y 50 campos (la mitad en forma horizontal y la otra mitad en forma vertical). Por lo tanto de cada muestra de leche contamos entre 40 y 100 campos microscópicos.

El total de las células somáticas contadas se dividen por el número de campos microscópicos contados lo que nos va a dar el promedio de células somáticas por campo.

Ese promedio se lo multiplica por el factor microscópico (FM) y así obtenemos el número de células somáticas por ml de leche.

Factor microscópico: se obtiene midiendo el diámetro del campo microscópico con un micrómetro de platina. La fórmula es la siguiente:

$$FM = \frac{10.000}{3,14 \times r^2}$$