UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

CARACTERIZACIÓN ESTACIONAL DE LA CALIDAD DE LA LECHE DE TANQUE EN PREDIOS DE LA REGIÓN LITORAL NORTE DEL URUGUAY

Efecto del Tiempo de Almacenamiento y Tamaño del Rodeo Sobre la Calidad Higiénico-Sanitaria

Lucía Grille Peés

TESIS DE MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL

URUGUAY

2016

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

CARACTERIZACIÓN ESTACIONAL DE LA CALIDAD DE LA LECHE DE TANQUE EN PREDIOS DE LA REGIÓN LITORAL NORTE DEL URUGUAY

Efecto del Tiempo de Almacenamiento y Tamaño del Rodeo Sobre la Calidad Higiénico-Sanitaria

Lucía Grille Peés

Silvana Carro	Elena de Torres	Edgardo Gianneechini
Directora de Tesis	**Co-directora**	**Co-director**

2016

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE

DEFENSA DE TESIS

Lourdes Adrién; DCV, PhD.
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República - Uruguay

Marcos Muñoz; DMV, PhD.
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
Universidad de Concepción - Chile

Dario Hirigoyen; DMV, MSc.
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República - Uruguay

2016

ACTA DE DEFENSA DE TESIS

INFORME DEL TRIBUNAL

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores Elena, Edgardo y Silvana, por haberme enseñado y apoyado en todo el proceso de la tesis.

A Juan Pablo por el apoyo brindado durante la redacción y análisis de datos, así como por los aportes y enseñanzas, las que fueron fundamentales para la culminación de este trabajo.

Al CRI lechero, que me dio la posibilidad de trabajar en el proyecto que llevó adelante el Consorcio durante el año 2012-2013, en el cual se enmarcó este trabajo. Donde conocí gente muy valiosa desde el punto de vista académico y humano, en especial al Ing. Pablo Chilibroste y a la Lic. Ec. Laura Piedrabuena.

A Oscar Pereira de PILI con quien compartí todo el trabajo de campo durante un año. Quien siempre estuvo presente para brindarme toda la información necesaria durante el desarrollo de la tesis.

A mis amigos Tanya, Nicolle, Álvaro, Liber, Mercedes, quienes estan y estuvieron siempre.

A mis compañeros del Dpto. de Ciencia y Tecnología de la leche, Karina, Mara y Andrea por apoyarme en los análisis de laboratorio.

A mi familia, en especial a Javier quien siempre esta conmigo apoyándome y acompañándome en todos los proyectos de la vida.

A todos mis compañeros y amigos que me dieron su apoyo y que de una forma u otra hicieron posible la realización de este trabajo.

INDICE

RESUMEN iii
SUMMARY iv
1. INTRODUCCIÓN 1
1.1. CALIDAD DE LECHE Y SISTEMA NACIONAL DE CALIDAD 2
2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS 6
2.1 CALIDAD HIGIÉNICO-SANITARIA 6
2.1.1 Calidad sanitaria de la leche 6
2.1.2 Calidad higiénica: recuento bacteriano, psicrótrofos y termodúricos 12
2.2 CASEINA Y FRACCIONES DE CASEINA EN LECHE 17
2.2.1 Síntesis de caseína en la glándula mamaria 17
2.2.2 Factores de variación de la composición de la leche 19
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 23
4. HIPÓTESIS 24
5. OBJETIVOS 24
5.1 OBJETIVOS GENERALES 24
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 24
6. MATERIALES Y MÉTODOS 25
6.1 Diseño experimental: selección de los establecimientos 25
6.2 Estratos y categorías según estación, tamaño del rodeo y tiempo de almacenamiento en tanque. 25
6.2.1 Efecto estacional 25
6.2.2 Tamaño del rodeo 25
6.2.3 Tiempo de almacenamiento en frío 26
6.2.4 Relevamiento de datos del establecimiento 26
6.3 Datos del ambiente y alimentación (concentrado y ensilaje) de los establecimientos estudiados, durante el período de estudio 26
6.3.1 Cálculo del Índice de temperatura y humedad (ITH) 26
6.3.2. Suplemento utilizado en cada estación 27
6.4 Obtención de las muestras de leche 27
6.5 Análisis de laboratorio 27

6.5.1 Análisis microbiológicos en leche 27
6.5.2 Análisis de composición y RCS en leche 28
6.6 Análisis estadístico 29
7. RESULTADOS 30
7.1 CARACTERIZACIÓN DEL RCS Y EFECTO DE LA ESTACIÓN SOBRE LAS VARIABLES DE CALIDAD 30
7.1.1 Calidad sanitaria: RCS y *S. aureus* 30
7.1.2 Calidad higiénica: recuento bacteriano, psicrótrofos, termodúricos y aislamientos de *Pseudomonas* 31
7.1.4 Producción de leche 32
7.2 EFECTO DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO EN TANQUE SOBRE LAS VARIABLES DE CALIDAD 33
7.2.1 Calidad sanitaria: RCS y *S. aureus* 33
7.2.2 Calidad higiénica: recuento bacteriano, psicrótrofos, termodúricos y *Pseudomonas* 34
7.3 EFECTO DEL TAMAÑO DEL RODEO SOBRE LAS VARIABLES DE CALIDAD HIGIÉNICO SANITARIA 35
7.3.1. Calidad sanitaria: RCS y *S. aureus* 35
7.3.2 Calidad higiénica: recuento bacteriano, psicrótrofos, termodúricos y aislamientos de *Pseudomonas.* 35
8. DISCUSIÓN 38
8.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS ESTABLECIMIENTOS SEGÚN RECUENTO DE CÉLULAS SOMÁTICAS EN EL TANQUE 38
8.2 VARIACIÓN ESTACIONAL DE LA CALIDAD HIGIÉNICO- SANITARIA Y DE COMPOSICIÓN 39
8.2.1 Asociación entre la calidad higiénico-sanitaria y la composición 46
8.3 EFECTO DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO DE LA LECHE Y TAMAÑO DEL RODEO SOBRE LA CALIDAD HIGIÉNICO- SANITARIA 47
9. CONCLUSIONES 50
10. IMPLICANCIAS 51
11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 53

RESUMEN

No existen datos publicados de la variación estacional del recuento de células somáticas (RCS), *Staphylococcus aureus*, psicrótrofos y termodúricos en leche de tanque ni la variación de los porcentajes de caseína total y de fracciones de caseína de la región litoral norte del Uruguay. Tampoco del efecto del tiempo de almacenamiento en frío en el establecimiento ni del tamaño del rodeo sobre la calidad higiénico-sanitaria. Esta información le permite a la industria conocer mejor su materia prima y adecuar las exigencias para elaborar productos inocuos y de buena calidad. Al sector primario le permite detectar áreas de trabajo a priorizar para evitar pérdidas y cumplir con los parámetros establecidos por el decreto de calidad y exigencias de la industria. Conocer la variación del porcentaje de caseínas y sus fracciones le permitirá a la industria la elaboración de productos de forma diferencial en determinadas épocas del año. En esta tesis se evaluó la variación estacional de la calidad de la leche en predios de la región litoral norte del Uruguay. Además del efecto del tiempo de almacenamiento en frío y del tamaño del rodeo sobre la calidad higiénico-sanitaria. Se realizaron muestreos mensuales de leche de tanque a 29 establecimientos de la región litoral norte durante 12 meses. Se analizaron porcentajes de caseína, fracciones de caseína, recuento de células somáticas y recuento bacteriano en todos los meses. En cada estación se realizó recuento de psicrótrofos y termodúricos así como aislamientos de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas*. En cada visita se relevaron datos sobre alimentación, número de vacas en ordeño, tiempo de almacenamiento en frío, capacidad y temperatura de tanque. Se observó que en la estación de verano los valores de recuento de células somáticas, *S. aureus* y psicrótrofos estuvieron por encima de los límites de calidad óptima, además de registrarse un aumento de termodúricos y *Pseudomonas* en esta estación. Los porcentajes de caseína total y fracciones de caseína disminuyeron. El mayor tiempo de almacenamiento aumentó el recuento de psicrótrofos. Las muestras de rodeos > 250 vacas presentaron mayor recuento de termodúricos, en verano y otoño. En conclusión se demostró que la calidad de la leche se afectó negativamente en la estación de verano, considerándose una estación “crítica” en la producción de leche de calidad, a pesar que el recuento bacteriano total se mantuvo por debajo de los límites reglamentarios. El RCS de leche de tanque mostró niveles altos (>250000 cél/ml) durante todo el año en base a criterios de calidad sanitaria, a pesar que los valores se encontraron por debajo del límite de recibo según reglamentación nacional. El aumento del tamaño del rodeo y el mayor tiempo de almacenamiento en tanque de frío afectaron negativamente la calidad higiénica de la leche en los establecimientos estudiados.

SUMMARY

There is no published data about the seasonal variation of bulk tank somatic cell count (BTSCC), *Staphylococcus aureus*, thermoduric and psychrotrophs in the bulk milk and the variation of the percentages of total casein and casein fractions in the Uruguay's north coast region. The effects of storage time and herd size on the hygienic-sanitary quality of milk are not known.

These results allow the industry to have a better understanding and to adapt its requirements to produce safe and good quality dairy products. It allows the primary sector to detect prioritizing working areas in order to avoid losses and meet the parameters established by the decree of quality and industry requirements. Knowing the variation in the percentage of casein and its fractions will allow the industry to develop products differentially at certain times of the year. In this thesis, the seasonal variation of milk quality in plots of Uruguay's north coast was studied. Also, the effect of cold storage time and herd size on sanitary and hygienic quality of milk. Monthly samples of bulk tank milk of 29 dairy farms were taken for twelve months. Percentages of casein, fractions of casein, BTSCC and bacterial count were analyzed. The count of psychrotrophic and thermoduric as well as the isolation of *S. aureus* and *Pseudomonas* was conducted in each season. In each visit, data of feeding, number of milking cows, time of milk storage, capacity and milk tank temperature was recorded. It was observed that in summer, the BTSCC, *S. aureus,* and psychrotrophic were above the optimum quality limits, as well as an increase of thermoduric count and *Pseudomonas* isolates. The percentages of casein and fractions of casein decreased. The longest storage time increased the pychrotrophic count. The samples > 250 cows presented a larger count of thermoduric in autumn and summer. In conclusion, it was demonstrated that there was a seasonal effect on milk quality. In summer, the quality of milk was inferior in comparison to the other seasons. In this same season, milk did not present optimum conditions for its industrialization due to the high number of somatic cells (>250000 cél/ml), *S. aureus* and psychrotrophic, which were above the regulatory limits of optimum quality.

The longest bulk tank milk storage time and increase in herd size negatively affected milk's hygienic quality in this region.

1. INTRODUCCIÓN

Para las industrias lácteas dedicadas a la elaboración y exportación de quesos es prioritario recibir leche de excelente calidad higiénico-sanitaria y de composición. La materia grasa y caseína de la leche están directamente relacionadas a la calidad y rendimiento de los productos elaborados, principalmente en la industria quesera. Esto se debe a que durante el proceso de elaboración estos componentes son los principales sólidos involucrados en el producto final (Walstra et al. 2001). Las industrias al conocer y controlar más detalladamente la calidad de la materia prima, aseguran la obtención de productos inocuos y de mayor valor nutritivo. Estas características son demandadas por el consumidor y por los mercados internacionales mejorando la competitividad. Es de destacar que las industrias de la Unión Europea (que manejan el 35% del mercado de lácteos), priorizan el pago a los productores en función del destino de la leche recibida. A modo de ejemplo, las industrias que se dedican básicamente a la producción de quesos valoran en forma diferencial aquella materia prima con alto porcentaje de proteínas, principalmente caseína (Fabro, 2011). La calidad higiénico-sanitaria tiene gran importancia para asegurar la inocuidad de los productos y una mayor eficiencia de sus procesos industriales, principalmente leche en polvo y quesos. En Uruguay actualmente, el Decreto 359/13 del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP), regula el pago por calidad de la leche en base a su calidad higiénico-sanitaria. A su vez las industrias realizan el pago de la leche remitida en base materia grasa y proteína (con mayor peso en la proteína) y bonifican mediante un plus (por encima del precio), cuando cumple con los requisitos de excelente calidad higiénico-sanitaria, menor a 300000 cél/ml RCS y menor a 50000 ufc/ml de recuento bacteriano (Conaprole, 2016).

En el año 2015 la producción de leche comercial en el Uruguay de acuerdo a la Dirección de Estadisticas Agropecuarias (DIEA) fue 2240 millones de litros, con una remisión de 2014 millones de litros a plantas y un total de 4341 establecimientos productores de leche. En los últimos años se registró un crecimiento en la producción, según el índice de productividad lechera medida por la DIEA para el año 2013 (último dato disponible). En el 2013 existió un crecimiento en la productividad del 11,5% con respecto al 2012 y un incremento del 61% al compararlo con el año 2007. La productividad creció por vaca y por hectárea y la superficie dedicada a la producción lechera disminuyó un 7% al comparar 2013 contra 2012. En este sentido, la productividad del sector lechero pasó de 731lts/há en 1977 a 2340 lts/há en 2007, lo que demuestra que la producción de leche por há se triplicó en 30 años. Esa tendencia se mantiene hacia el año 2013, registrándose 2500 lts/há para ese año. Por otro lado, uno de los principales fenómenos que se

dieron en el Uruguay en los últimos años, es la reducción de tambos y de remitentes lo que condujo a unidades más productivas (Uruguay XXI, 2015), el número de predios en el año 1986 era de 7335 mientras que en 2013 se registraron 4291 establecimientos (DIEA, 2015). Uruguay es uno de los principales países exportadores de leche y productos lácteos en la región, exporta el 70% de su producción (DIEA, 2015), mientras que Argentina destina el 78% para el mercado interno y sólo un 22% para la exportación (MINAGRI, 2015). En Uruguay los principales productos exportados incluyen leche en polvo entera: 27%, leche en polvo descremada: 14%, quesos: 21% y manteca: 9,85%, de estos datos se desprende la importancia del queso como producto de exportación (INALE, 2013). Es importante resaltar que la mayor parte de la leche producida se destina a la industrialización. De 2240 millones de litros/año de leche producidos en el año 2014, el 90% de su producción se destinó a la industria (2014 millones de litros/año). En relación a los predios remitentes, de 4341 predios lecheros que generaron el total de la producción en ese año, 2927 remitieron su producción a las industrias procesadoras (DIEA, 2015). El sector industrial lechero, integrado por empresas nacionales y extranjeras ha expandido continuamente su capacidad, diversificando su producción en el mercado interno y exportando diversos productos (Uruguay XXI, 2015). El sector industrial lácteo nacional, está compuesto por unas 40 industrias habilitadas por el MGAP. Las empresas cooperativas captaron la mayor proporción de la leche contando con un 72% del total. Conaprole la principal industria cooperativa captó el 68% de la leche, siguiendo en orden de importancia INDULACSA, CLALDY, CALCAR y por último PILI, con un 3% de la leche captada (INALE, 2014). Ecolat y Schreiber Foods en el año 2014, se encontraban en segundo y tercer lugar como empresas exportadoras, pero en el año 2015 estas empresas cerraron su producción, no estando en funcionamiento actualmente. En la región litoral norte formando parte importante de la cadena agroindustrial de Uruguay se encuentran PILI y CLALDY, ubicadas en los Departamentos de Paysandú y Río Negro junto con sus productores remitentes. En estas dos industrias la mayor parte de su producción se destina a la exportación (aprox. 70%), teniendo como productos principales queso (tipo Edam, Gouda, Dambo, Mozzarella, Reggianito) y suero en polvo.

1.1. CALIDAD DE LECHE Y SISTEMA NACIONAL DE CALIDAD

De acuerdo con la FAO/OMS (2001), en todos los países compete al sector alimenticio cumplir con los requisitos reglamentarios en materia de calidad e inocuidad de los alimentos desde los establecimientos rurales, el transporte, el almacenamiento, el procesamiento y la venta al consumidor final. La calidad de la leche abarca conceptos como seguridad, composición, higiene y estado de salud de la vaca (Katz et al. 2016), lo que en su conjunto determinarán la aptitud de la leche para el uso asignado. En la actualidad

uno de los aspectos que definen el precio de la leche cruda es la calidad higiénico-sanitaria evaluada mediante el recuento bacteriano y el RCS. El recuento bacteriano indica la calidad higiénica de la leche, aportando información respecto a la higiene del tambo, rutina de ordeñe, lavado de equipos, capacidad de frío entre otros y nos permite identificar probables fuentes de contaminación (Calvinho et al. 2001). A su vez, el contenido de microorganismos presentes en la leche afectará los productos que con ella se elaboren, otorgando características sensoriales indeseables y/o acortando su vida útil (Leitner et al. 2011). El contenido de células somáticas en la leche nos permite conocer el estado de salud de la ubre y tiene directa relación con la composición de la leche (Hernández y Bedolla, 2008). El uso del RCS como un indicador indirecto de la inflamación intramamaria es el método estándar para el monitoreo de la calidad sanitaria de leche. A través del RCS el productor puede controlar el progreso de las inflamaciones intramamarias (Sharma et al. 2011). Por lo tanto, obtener el resultado y análisis de ambos recuentos en conjunto (RCS y recuento bacteriano) nos permite conocer la calidad higiénica y sanitaria de la leche. Esta calidad nos brinda información de las condiciones en que se ha mantenido ese alimento durante toda la cadena láctea, desde su producción, almacenamiento, transporte y procesamiento, la cual es muy valiosa tanto para la industria y productor lechero como para el consumidor final. El Sistema Nacional de Calidad de la Leche fue creado por el MGAP en el año 1995, y entró en vigencia en el año 1997. Este sistema establece categorías de calidad de la leche remitida a planta de acuerdo a la calidad higiénica medida a través del recuento bacteriano y la calidad sanitaria medida mediante RCS. Además las industrias tienen la posibilidad de crear categorías para establecer bonificaciones extras favoreciendo de esta manera la producción de leche de calidad. Conaprole actualmente tiene como límite para leche de calidad óptima 300000 cél/ml para RCS y 50000 ufc/ml para recuento bacteriano. Este sistema en el correr de los años ha tenido una serie de modificaciones de los parámetros establecidos (1997 y 1999) ajustándose a las exigencias del mercado internacional y a la realidad nacional. En noviembre de 2013 se aprobó la última modificación (Decreto 359/13) (MGAP, 2013). En este decreto se establecen los límites máximos de recibo para RCS y de recuento bacteriano. Estos límites serán en noviembre de 2016 de 100000 ufc/ml recuento bacteriano y 400000 cél/ml RCS (Cuadro I).

Cuadro I. Valores máximos admitidos para recuento de células somáticas y recuento bacteriano de acuerdo al Decreto 359/13.

Fecha de entrada en vigencia del decreto	Recuento Microbiano (ufc/ml)	Células Somáticas (céls/ml)
A la entrada en vigencia	500.000	800.000
Al año de entrada en vigencia	300.000	600.000
A los tres años de entrada en vigencia	100.000	400.000

Se espera que a partir de noviembre de 2016, los límites de calidad óptima fijados por las industrias para la bonificación de la leche, sean progresivamente más exigentes. Debido al aumento de las exigencias en los límites de recibo a planta según reglamentación nacional (Decreto 359/13).

Por otro lado, relacionado a las exigencias que existen en Uruguay sobre la calidad microbiológica de la leche, el Reglamento Bromatológico Nacional (según lo establecido en el Decreto Nº 315/ 994 de fecha 05/07/1994), establece como leche cruda no apta para consumo o elaboración de cualquier producto alimenticio, si superan valores de recuento de bacterias aerobias mesófilas (ufc/ml) de $5x10^6$ ufc/ml, 10^4 ufc/ml de coliformes totales y 10^3 ufc/ml de *Staphylococcus aureus* (MSP, 1994).

En un estudio realizado en Uruguay sobre la calidad de leche de cisternas se registraron los mayores valores de RCS en verano (374090 cél/ml) seguido de otoño (344370 cél/ml) y primavera (343720 cél/ml) (De Torres, Facultad de Veterinaria, UdelaR, comunicación personal). En este mismo estudio se relevó el RCS por región. La región litoral norte mostró los mayores valores de RCS (396310 cél/ml), seguido de la región litoral sur (335330 cél/ml), región noroeste (318750 cél/ml) y por último la región centro sur donde se registró el menor valor de RCS (306360 cél/ml). Actualmente, en el sistema de pago por calidad, además de los parámetros higiénicos sanitarios, se fija un mínimo de 2,9 g/100g de materia grasa y 2,7 g/100g de proteína total para que la leche pueda ser remitida a planta (MGAP, 2013). Este último componente es el de mayor impacto sobre el precio obtenido por el productor y es particularmente importante para las industrias, principalmente las que tienen a los quesos como principal producto de elaboración. Las industrias fijan el precio de la leche en base a la composición promedio de la leche remitida. Por encima de ese valor la industria paga por kg de grasa y proteína. Ese precio está determinado en un 30% por la grasa y un 70% por

la proteína (fuente: comunicación personal PILI, 2013; Conaprole, 2015). Esto destaca la importancia de la calidad de la materia prima vinculada a la aptitud industrial. La investigación nacional respecto a calidad composicional de la leche se ha centrado principalmente en los grandes componentes de la misma (proteína y grasa), no así a la composición de la caseína y sus fracciones. En Uruguay se han reportado valores promedio de 2,88% de proteína en vacas alimentadas con pastura y ensilaje de maíz de planta entera (Acosta, 2008). Hirigoyen et al. (2012), reportaron valores de caseína en leche en las diferentes estaciones del año en Uruguay. Registrando que invierno y otoño fueron las estaciones con valores más altos (2,62 y 2,55%, respectivamente) seguido de primavera (2,53%) y verano con los menores valores promedio (2,46%). En un estudio más reciente (2013-2014), en donde se monitoreó la calidad de la leche recibida en plantas, de todas las industrias lecheras de Uruguay, se reportaron valores de 2,48%±0,08 de caseína (valor promedio anual). En relación a las fracciones de caseína, en nuestro país en el mismo estudio se obtuvieron los siguientes resultados (expresados en porcentaje de caseína total): α-caseina 1,21±0,10, β-caseína 0,86±0,09 y κ-caseína 0,41±0,04 (De Torres, Facultad de Veterinaria, UdelaR comunicación personal). Por otro lado, Artegoitía (2013), en su trabajo registró valores de β-caseína de 445,64 ± 3,96 g/kg y de κ-caseína 83,49 ± 2,37 g/kg.

En Uruguay y principalmente en la región litoral norte existe poca información respecto a los porcentajes de caseína y fracciones en leche de tanque, así como su variación estacional. En relación a la calidad higiénico-sanitaria de leche de tanque, si bien existe información sobre RCS y recuento bacteriano, no existe información publicada de su variación estacional, ni del perfil microbiológico del tanque en estos establecimientos (psicrótrofos, termodúricos, principales microorganismos causantes de mastitis). Este perfil es de suma importancia para evaluar la calidad de la leche que llega a la industria. Por lo tanto, en este estudio se propone describir la variación estacional de la calidad higiénico-sanitaria, porcentajes de caseína y fracciones de caseína de la leche de tanque en predios de la región litoral norte del país. Además de estudiar la influencia del tiempo de almacenamiento en tanque y el tamaño del rodeo sobre las variables de calidad higiénico-sanitaria.

2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

2.1 CALIDAD HIGIÉNICO-SANITARIA

2.1.1 Calidad sanitaria de la leche

La calidad sanitaria se evalúa a través del recuento celular, dado que uno de los componentes iniciales de la respuesta inflamatoria es la migración de leucocitos polimorfonucleares (PMN) al tejido mamario produciendo un aumento del RCS de la leche. El RCS es utilizado como indicador de la prevalencia de mastitis subclínicas en vaca lechera (Harmon, 2001). Este recuento tiene una importante influencia en la composición de la leche, siendo determinante para obtener un producto con buen rendimiento y de buena calidad. Vincular la presencia de mastitis en el rodeo lechero con la calidad de la leche es de suma importancia. Mastitis, es una enfermedad multifactorial con una alta prevalencia a nivel de los rodeos lecheros (Seegers et al. 2003). Es considerada de gran importancia económica en el mundo (Swinkels et al. 2005) ya que genera importantes pérdidas a los principales actores de la cadena láctea. A nivel primario al ser una enfermedad muy persistente genera pérdidas por disminución de la producción de leche, aumento de los costos de producción, pérdidas en el precio por reducción de la calidad (Rabello et al. 2005; Seegers et al. 2003; Swinkels et al. 2005; Wellenberg et al. 2002; Dos Santos et al. 2002), aumento en el número de tratamientos clínicos y descarte temprano de vacas (Cerón et al. 2002). A lo que se suma el riesgo potencial de diseminación de patógenos a las vacas que no están infectadas y reducción de la fertilidad en la lactancia temprana (Barkema et al. 2006), además de las pérdidas generadas a la industria láctea (Dufour et al. 2012; Boulanger et al. 2003). Se han estimado pérdidas económicas en el mundo de 35 billones de dólares americanos anuales por esta enfermedad (Wellenberg et al. 2002). Los costos anuales de pérdidas por mastitis (clínica y subclínica) en EEUU han sido estimados en 1,5 a 2 billones de dólares. Mientras que las pérdidas de producción de leche debidas sólo a mastitis subclínicas y a altos costos por reposición de vacas con altos RCS fueron estimados en 960 millones de dólares (Wells et al. 1998). En nuestro país y en la región no hay datos recientes acerca de las pérdidas económicas causadas por esta enfermedad. En Uruguay las pérdidas por mastitis fueron estimadas en U$S 21345000, según la incidencia registrada en ese momento (Gianneechini et al. 2002a). En ese mismo estudio se calcularon las pérdidas teóricas anuales en cada establecimiento lechero según el nivel de RCS, observando que con niveles de 300000 cél/ml las pérdidas económicas por mastitis eran de U$S 5700 anuales, mientras que con RCS de 500000 cél/ml las pérdidas se incrementan a U$S 12006. La mastitis se puede presentar en forma: clínica o subclínica. Mastitis clínica, es aquella en la que se presentan alteraciones

fácilmente detectables tanto en la leche (grumos, coágulos, cambios de coloración, apariencia acuosa) como en la ubre (inflamación, dolor, temperatura). Estos síntomas pueden permanecer locales o generalizarse y ocasionalmente resultar en una infección sistémica. En caso de ausencia de signos visibles, se denomina mastitis subclínica y se puede diagnosticar de forma indirecta a través del RCS (Signorini et al. 2003). En Uruguay se ha encontrado una elevada prevalencia de mastitis subclínica (50%) (Gianneechini et al. 2002b y 2005), en comparación con otros países como Finlandia y Australia (29% y 30% respectivamente) (Plozza et al. 2011; Pitkäla et al. 2004). Con relación a la incidencia de mastitis clínica 10,9 cada 100 vacas- año riesgo presentaron esta enfermedad en la cuenca Sur en el año 2002-2003 (Gianneechini et al. 2005). La reducción en la producción de leche atribuida a mastitis subclínica, ocasiona un 70-80% del total de las pérdidas (Gianneechini et al. 2002a). La mastitis subclínica es un gran problema en la industria, muchas veces no es detectada y la leche es remitida dando grandes variaciones en los aislamientos de microorganismos causantes de mastitis en leche de tanque. El RCS en leche de tanque está muy influenciado por la prevalencia e incidencia de mastitis clínica y subclínica en el rodeo (Olde Riekerik et al. 2006). Depende principalmente de la infección intramamaria y en menor medida de la parición, estado de lactación, tipo de instalaciones, acceso a la pastura, manejo y factores medioambientales (temperatura, humedad y estación) (Olde Riekerink et al. 2007). El RCS es considerado como un indicador de la calidad de la leche en muchas especies, especialmente rumiantes y humanos (Hunt et al. 2013; Sharma et al. 2011). En bovinos cuando el RCS está por encima de 200000 cél/ml se considera que la ubre está inflamada. En la Unión Europea cuando el RCS es superior a 400000 cél/ml, la leche no es apta para el consumo humano (Li et al. 2014). El límite legal de RCS de aceptación por parte de las industrias varía entre los diferentes países, por ejemplo en Canadá y USA es de 500000 cél/ml y 750000 cél/ml respectivamente (Olechnowicz y Jaskowski 2012; Schwarz et al. 2011). En Uruguay como se dijo anteriormente, según el decreto que entró en vigencia en el año 2013, en noviembre de 2016 el límite de aceptación en la industria será de 400000 cél/ml (Cuadro I). En cuanto a la relación entre el RCS y las pérdidas en producción y composición de leche Bartlett et al. (1990), reportaron que no se producen pérdidas en producción de leche con recuentos celulares de leche mezcla menores o iguales a 250000 cél/ml. Si dichos recuentos aumentan a 400000 cél/ml las pérdidas por leche que se deja de producir son del orden del 5- 6 %.

La calidad sanitaria juega un rol muy importante en la composición de la leche, dado que la inflamación de la glándula mamaria produce alteraciones no sólo en la producción sino también en la composición de la leche y sus propiedades físico-químicas. Se ha demostrado relación entre el RCS y la disminución de la caseína (por efecto de la proteólisis), resultando en

efectos negativos sobre el rendimiento quesero (Barbano et al. 1991, Forsbäck et al. 2010, Barbosa et al. 2013). La proteólisis de la caseína tiene dos orígenes: el primero relacionado con el deterioro de la ubre infectada lo que incrementa la cantidad de proteasas endógenas, especialmente aquellas del sistema plasmina-plasminógeno (Albenzio et al. 2004), el segundo mediante los microorganismos que pueden secretar proteasas exógenas resistentes al calor las que se podrían producir durante el almacenamiento en frío (Guerrero et al. 2003). Por lo que la proteólisis que se da en la leche es debida a proteasas nativas y también a proteasas producidas por bacterias psicrótrofas durante el almacenamiento de la leche (Fajardo-Lira et al. 2000). Estos cambios en el contenido de proteína, grasa, lactosa, iones y enzimas que componen la leche son producidos en parte porque se afecta la actividad de síntesis del epitelio de la glándula mamaria. Ha sido reportado hasta un descenso del 10% en el contenido de lactosa, 9% en el contenido graso y hasta un 18% en el porcentaje de caseína (Harmon, 1994). Estos cambios son de importancia para determinar el valor nutricional del producto y de gran significancia tecnológica para la obtención de los diferentes subproductos de la leche. En este sentido, Barbano et al. (1991) y Forsbäck et al. (2010), reportaron disminución en los porcentajes de caseína y fracciones de caseína cuando los RCS estaban por encima de 100000 cél/ml (incluida α y β caseína) a causa de una menor síntesis de los componentes en la glándula mamaria, o al aumento de la actividad enzimática. Dohoo y Meek (1982), reportaron que valores de caseína, lactosa y grasa disminuyen con RCS por encima de 250000 cél/ml. Por otro lado, muchos estudios indican que un alto RCS en leche tiene un efecto negativo sobre los productos lácteos. Le Roux et al. (2003), observaron que con RCS por encima de 100000 cél/ml aumenta la actividad de la enzima plasmina afectando negativamente las características de los derivados lácteos. Otros autores, reportaron que por encima de 100000 cél/ml en leche destinada a la elaboración de quesos, aumentaron las pérdidas de proteína en el suero, obteniendo mayor tiempo de formación de coagulación y cuajadas más débiles (Politis et al. 1988).

Diferentes tipos de microorganismos son fuente de infección para la ubre a través de su penetración por el orificio del pezón. Los microorganismos que causan mastitis se pueden agrupar en contagiosos, ambientales u oportunistas. La fuente primaria de infección para los patógenos contagiosos es la glándula mamaria infectada, desde donde los patógenos son diseminados principalmente durante el ordeñe (Smith y Hogan, 1995). Se consideran microorganismos contagiosos: *S.aureus, Streptococcus agalactiae, Streptococcus dysgalactiae, Corynebacterium bovis* (Saran y Chaffer, 2000) y *Mycoplasma spp*. (Fox y Gay, 1993). La mastitis causada por *S. aureus* en la vaca lechera es de distribución mundial (Dos Santos et al. 2002). Es responsable de la mayoría de las mastitis bovinas en muchos países, contaminando la leche y subproductos (Jorgensen et al. 2005a). En

un estudio realizado en la cuenca tradicional de Uruguay se obtuvo que la prevalencia de mastitis subclínica fue de 50% donde el 48% de los aislamientos fueron *S. aureus*, con un 6% adicional combinado con *Streptococcus* (Gianneechini, 2005). *Staphylococcus aureus* es considerado un microorganismo muy dificultoso de controlar una vez que ha comenzado su diseminación, dado que los animales son la principal fuente de infección. Se encuentra primariamente en la ubre, siendo fácilmente detectable en leche de tanque. Además, al ser la ubre la principal fuente de infección se transmite básicamente a través de la máquina de ordeñe (Saran y Chaffer, 2000). Este microorganismo puede vivir varios meses en lesiones del pezón y en otras localizaciones del cuerpo de la vaca y cuando es hallado en leche de tanque, puede ser indicador de infecciones intramamarias en los rodeos (Olde Riekerink et al. 2006). A su vez al producir toxinas termoestables es de gran importancia en las intoxicaciones alimentarias, principalmente en el caso de los quesos artesanales (elaborados con leche cruda) representando un gran riesgo para la salud pública (Jorgensen et al. 2005b). Por otro lado, se ha demostrado que las infecciones causadas por *S. aureus* afectan la producción y composición de la leche (Reksen et al. 2007). En relación a la composición, Barbosa et al. (2013), reportan que *S. aureus* afectó negativamente el contenido de sólidos no grasos de la leche (SNG) y materia grasa (MG). En leche de tanque *S. aureus* y *Str. agalactiae* se utilizan como complemento para monitorear la calidad de la leche del establecimiento, junto con el recuento bacteriano total, psicrótrofos y termodúricos (Gillespie et al. 2012). Como dijimos anteriormente el límite de *S. aureus* en leche de tanque en Uruguay es de 1000 ufc/ml (MSP, 1994), mientras que en vaca individual se consideran como “bajos” recuentos menores a 1500 ufc/ml y “altos” mayores a 1500 ufc/ml (Reksen, 2007).

2.1.1.1 Factores de variación de la calidad sanitaria de la leche

A pesar que las infecciones intramamarias son la mayor causa de variación del RCS (Schepers et al. 1997), existen otros factores como estado de lactación, estación, nivel de producción de leche y número de lactancias que hacen variar el recuento celular (Sevi et al. 2001). Estos últimos afectan el RCS pero no hacen variar el *status* de un establecimiento de “sano” a “enfermo”. Durante las infecciones aumentan los PMN en leche disminuyendo su calidad (Li et al. 2014). Además existe una relación negativa entre el RCS y la producción de leche (Hand et al. 2012), se ha reportado que durante el verano el RCS se incrementa y disminuye la producción de leche (Smith et al. 2000; West, 2003). En rodeos con partos estacionales el RCS en leche de tanque tuvo un patrón estacional observándose los mayores niveles en verano-otoño y los más bajos en primavera (Sargeant et al. 1998). Los patrones estacionales también pueden ser observados en el RCS en vacas individuales, registrando recuentos generalmente más altos en verano (Olde Rieckerink, 2007). En este sentido,

Green et al. (2006), sugieren que parte de la variación estacional en el RCS en leche de tanque es causada por la larga proporción de vacas con altos recuentos individuales en verano. Esta situación es evidente en vacas que han presentado mastitis en algún momento de lactancia (De Hass et al. 2002). Al final de la lactancia, la baja producción de leche podría aumentar el RCS en leche de tanque por menor efecto dilución (cuando los RCS no superan las 250000 cél/ml) (Ferreira et al. 2015). Cuando los RCS están por encima de 250000 cél/ml el incremento en el RCS es independiente de la producción, el que aumenta por un mayor número de infecciones intramamarias en el rodeo. En relación a esto, Pighetti et al. (2015), reportaron que con valores de RCS de 388000 cél/ml en leche de tanque, el RCS fue independiente de la producción y de la estación. En vacas individuales, Halasa et al. (2009), registraron que las vacas de alta producción presentaron bajos RCS, por lo que podría considerarse el efecto dilución en estos animales. Sugiriendo que en este caso el RCS podría no reflejar el estado sanitario de la vaca de alta producción. Green et al. (2006), también demostraron que bajos RCS han sido inversamente relacionados con alta producción de leche, lo que estaría dado por un efecto dilución. Este efecto fue demostrado en bajos RCS (<50000 cél/ml), lo que sugiere una subestimación de los RCS en vacas de alta producción, pero no ha sido demostrado en recuentos altos. Por otra parte, en las épocas en que aumenta la temperatura ambiental, la vaca tiene mayor susceptibilidad de adquirir nuevas infecciones intramamarias (Olde Riekerink et al. 2007). Como se mencionó anteriormente *S. aureus* es el microorganismo causante de mastitis más prevalente en Uruguay (Gianeechini et al. 2002b), por lo que en verano aumentaría la posibilidad de aislar dicho microorganismo en leche de tanque. También se ha reportado que la vaca tiene mayor riesgo de adquirir infecciones dos semanas antes y después del parto (Oliver et al. 1988). Los *Staphylococcus coagulasa* positiva, principalmente el *S. aureus* son adquiridos tanto del ambiente como a través de la transmisión vaca a vaca a partir de rebaños infectados (Ruegg, 2012). Aunque la mayor fuente de contagio es la transmisión vaca-vaca (De Torres, 2010). *Staphylococcus aureus* fue aislado de la piel de la ubre y pezones de bovinos, piel de las manos de humanos, de otros animales no bovinos, aire y equipamiento (Roberson, 1994). Por esta razón, son muy importantes las condiciones de higiene y el control sanitario para determinar posibles portadores. Este microorganismo puede llegar a la leche cruda a través de la ubre y canal del pezón (particularmente si hay lesiones presentes) (Keefe, 2012), contaminando los productos lácteos. Sobre la estacionalidad de *S. aureus* en leche de tanque, Signorini et al. (2003), encontraron que otoño fue la estación donde se registraron mayores aislamientos. Coincidiendo además, que en esta estación se encontraron los mayores aislamientos en manos del ordeñador y ubre, aunque en bajos recuentos (10 ufc/ml y ubre 140 ufc/ml). Por otro lado, Zucali et al. (2011), obtuvieron mayores recuentos de

Staphylococcus coagulasa positiva en invierno y concluyeron que un motivo podría ser que algunas bacterias de este grupo de microorganismos como *S. aureus* forman “biofilms” en la piel de la ubre y también en la máquina de ordeñe (Fox et al. 2005). Este tipo de biofilms son resistentes a los agentes antimicrobianos y durante el invierno, el descenso en la temperatura del agua en el ciclo de lavado de la máquina de ordeñe, puede facilitar su supervivencia (Costerton et al. 1999). Existen estudios sobre la prevalencia de microorganismos patógenos para el hombre que se pueden transmitir por leche y productos lácteos (Jayarao et al. 2004) pero las condiciones de producción de esos estudios son muy diferentes a las de Uruguay. En este sentido, la mayoría de los estudios que provienen de la UE, fueron realizados en establecimientos estabulados y con tamaños del rodeo que no superan en promedio las 100 vacas en ordeñe (Hill et al. 2012).

En los últimos años en Uruguay y a nivel mundial ha habido una tendencia a disminuir el número de explotaciones lecheras manteniéndose o incluso aumentando la producción de leche total del país. En Uruguay aumentó el tamaño de los establecimientos lecheros en comparación con años anteriores (mayor número de animales) por explotación (DIEA, 2015). Esto ha sido de gran preocupación a la industria lechera de algunos países, ya que este aumento en el tamaño de las explotaciones podría generar consecuencias en la calidad de la leche y por ende afectar a la industria lechera (Archer et al. 2013). En este tema la bibliografía es contradictoria. En un trabajo realizado en EEUU por Allore et al. (1997), observaron que los rodeos más chicos presentaron mayores porcentajes de muestras con recuentos mayores de 500000 cél/ml, en comparación con los rodeos más grandes (mayor a 62 vacas en ordeño). Sugiriendo que el efecto del aumento en el RCS es más notorio en rodeos de menor tamaño. Estos resultados son consistentes con otros publicados más recientemente, quienes observaron que los rodeos más grandes tuvieron menor RCS (Oleggini et al. 2001), explicado por las diferentes medidas de manejo y rutina de ordeñe. En contraposición a esto, en un trabajo realizado en Irlanda se encontró que el aumento del tamaño de los rodeos estuvo asociado a un aumento del RCS. Este aumento se puede deber al mayor riesgo de transmisión de patógenos y mayor susceptibilidad de los cuartos en rodeos de mayor tamaño (Archer et al. 2013). Lo que puede atribuirse a malas prácticas de manejo, cantidad de personal no acorde al tamaño del rodeo y rotación del mismo. Problemas durante la rutina de ordeñe (aumentando el riesgo de exposición a microorganismos contagiosos), mal manejo de la alimentación, camas, entre otros. Esto coincide con trabajos previos, donde también se asociaron altos promedios de RCS con tamaño de rodeos grandes (Barkema et al. 1998).

2.1.2 Calidad higiénica: recuento bacteriano, psicrótrofos y termodúricos

La calidad de la leche cruda y pasteurizada como de los productos lácteos derivados es la consecuencia de todas las actividades desarrolladas durante el proceso de producción, desde las granjas hasta la transformación en la industria láctea (Vilar et al. 2011; WHO/ FAO, 2008). La leche bovina debido a sus componentes, contiene los requerimientos nutricionales necesarios para el crecimiento del ternero (Haug et al. 2007). Esto lleva a que también sea una excelente matriz para el crecimiento de un gran número de microorganismos deteriorantes y patógenos para el ser humano (Hill et al. 2012). La contaminación de la leche cruda puede ocurrir a partir de la ubre (microorganismos asociados a mastitis), de microorganismos del ambiente de las superficies de la ubre y el pezón y de inadecuadas medidas de limpieza y sanitización del equipamiento de ordeñe. Insuficiente capacidad de frío y prolongados tiempos de almacenamiento también pueden aumentar el conteo bacteriano por aumento del crecimiento durante el almacenamiento de la leche (Elmoslemany et al. 2009). Esto hace que no siempre sea sencillo de determinar la causa de un alto conteo bacteriano en leche (Murphy y Boor, 2000). El recuento de mesófilos aerobios totales (RMAT) lo constituyen bacterias que crecen entre 30 – 35ºC en condiciones aerobias, provenientes de la piel de los pezones, las heces, manos del ordeñador, equipos, suelo, agua, etc. Su importancia radica en que reflejan la calidad higiénica de la materia prima y la forma en que fue manipulado el producto. Cuanto mayores sean los valores del recuento bacteriano, menor vida útil. Un RMAT alto nos indica: materia prima no apta para consumo, malas prácticas de manipulación en su elaboración, mayor riesgo de que existan microorganismos patógenos (APHA, 2001). Hayes et al. (2001), consideran que en particular el recuento bacteriano es el de mayor interés para el productor porque influye en el precio de la leche y se dan incentivos cuando su recuento es bajo. En Uruguay, existen bonificaciones por parte de la industria, cuando el recuento bacteriano es menor a 50000 ufc/ml (Conaprole 2015). Los últimos datos disponibles nacionales muestran que en el período noviembre-enero (2015-2016), la media geométrica de las 3822 muestras analizadas fue 46 x 10^3 ufc/ml (Colaveco, 2015). Por lo que el recuento bacteriano, nos muestra la eficiencia de los procedimientos de limpieza y las temperaturas de almacenamiento de la leche y secundariamente la higiene de las ubres que ordeñamos. El análisis de leche de tanque, es usado por las industrias lácteas, veterinarios y productores de leche como indicador de la calidad (Gillespie et al. 2012). A través de un perfil microbiológico de la leche del tanque se puede prevenir y actuar sobre los posibles puntos de contaminación. Un alto recuento bacteriano en tanque además de ser un indicador de higiene del ordeñe, afecta la calidad de la leche pasteurizada y productos lácteos disminuyendo la vida útil y sus características sensoriales (Barbano et al. 2006). Es de gran importancia en los casos en que esa leche es utilizada para la elaboración

de quesos, debiendo tener para la elaboración de estos productos recuentos particularmente bajos (Innocente y Biasutti, 2013). De acuerdo a la reglamentación de la Unión Europea, (European Unión, 2004) los predios remitentes a plantas elaboradoras de quesos deben tener recuentos bacterianos por debajo de 100000 ufc/ml. El enfriamiento rápido y el mantenimiento en frío favorece el crecimiento de bacterias psicrótrofas dando un cambio en la microbiota nativa de la leche, con predominio de Gram negativos (Barbano et al. 2006). La población bacteriana Gram negativa luego del almacenamiento en frío por períodos prolongados puede constituir hasta más del 90% de la microbiota total (Martins et al. 2006). Los microorganismos psicrótrofos se definen como microorganismos mesófilos que se adaptaron a crecer a temperatura de refrigeración, por lo que al aumentar el RMAT aumentaría también el número de psicrótrofos. Jay et al. (2005), indican que los psicrótrofos sintetizan lípidos neutros y fosfolípidos que contienen una proporción más elevada de ácidos grasos insaturados cuando crecen a bajas temperaturas en comparación con temperaturas más elevadas. Este aumento en el grado de insaturación de los ácidos grasos, implica un descenso en el punto de fusión de los mismos y tiene la función de mantener los lípidos en estado líquido con mayor movilidad, con lo que permite a la actividad de la membrana continuar su habitual cometido. Son capaces de crecer a temperaturas de 7ºC o inferiores aunque su temperatura óptima de multiplicación es superior. Si bien son eliminados durante la pasteurización de la leche, algunas de sus enzimas (lipasas y proteasas) son termorresistentes y generan importantes cambios negativos en la calidad de los productos lácteos. Numerosos microorganismos psicrótrofos han sido aislados de leche cruda: *Pseudomonas (Ps.), Enterobacter, Flavobacterium, Klebsiella, Aeromonas, Acinetobacter, Alcaligenes y Achromobacter* (Hayes, 2001). Estos microorganismos pueden encontrarse ampliamente distribuidos en el ambiente: suelo, agua y formando parte de la microbiota normal de animales y del hombre. Las más frecuentemente aisladas en leche cruda son algunas especies como *Ps. fluorescens, Ps. fragi, Ps. aeruginosa y Ps. Putrefaciens* (Signorini et al. 2003). Los psicrótrofos al provenir del ambiente también son considerados indicadores de calidad higiénica de la leche, por lo que si no hay una correcta limpieza de la ubre antes del ordeñe, la leche puede contaminarse con microorganismos que provienen de estos orígenes (Hayes et al. 2001). En algunos países el recuento de psicrótrofos se utiliza como complemento para determinar la calidad de la leche y es requerido principalmente cuando la leche será sometida a determinados procesos tecnológicos específicos. Por ejemplo, los límites reglamentarios para calidad higiénica en República Checa según el Veterinary Care Act No. 166/1999 citado por Cempirková (2002), están fijados en ≤ 100000 ufc/ml de recuento bacteriano y ≤ 50000 ufc/ml de psicrótrofos. En el caso de que la leche sea utilizada en procesos tecnológicos, las exigencias aumentan, utilizando los límites fijados por la UE

de <30000 ufc/ml para recuento bacteriano y <5000 ufc/ml para psicrótrofos (European Unión, 2004). En Escocia se reportaron valores promedio de estos microorganismos a partir de silos de industrias lácteas, de 1,3 x 10^5 ufc/ml promedio (2 medias geométricas mensuales) y un 70,2% de las bacterias presentes pertenecieron al género *Pseudomonas* (Mcphee y Griffiths, 2011). Según Guerrero et al. (2003), el valor límite aceptado de psicrótrofos por debajo del cual no se generan perjuicios en la industria (efecto negativo sobre la caseína) es de 10^6 ufc/ml. Estos autores afirman que no todos los microorganismos psicrótrofos producen enzimas caseinolíticas.

Las bacterias termóduricas se caracterizan por ser microorganismos capaces de resistir temperaturas de pasteurización en leche. En los últimos años se incrementaron las campañas de seguridad alimentaria a causa de reiterados brotes de enfermedades alimentarias trasmitidas por alimentos (Buehner et al. 2014). Esto ha llevado a que se establezca la pasteurización como un paso necesario para el consumo de leche fluida y otros productos lácteos (Gleeson et al. 2013). En Uruguay la pasteurización es obligatoria para el consumo de leche fluida (MSP, 1994). Aun así este procedimiento aplicado en las industrias lácteas para la eliminación de los microorganismos patógenos en leche, no inactiva completamente los microorganismos termoresistentes. Algunas esporas altamente resistentes al calor pueden sobrevivir al proceso de UHT e incluso a los procesos de secado por aspersión y persistir en polvos pasteurizados (Buehner et al. 2014). La Food and Drug Administration (FDA) en EEUU declaró a los microorganismos termodúricos, termófilos, psicrótrofos y bacterias formadoras de esporas como los microorganismos que presentan el mayor riesgo de deterioro en productos lácteos (Hull et al. 1992). El recuento de termodúricos es usado como indicador de sanitización de los equipos en la industria y los establecimientos (Gillespie et al. 2012). Recuentos entre 100 y 200 ufc/ml son indicativos de una adecuada limpieza y sanitización de los sistemas de ordeño (Jayarao et al. 2004). Dentro de los microorganismos termodúricos *Bacillus cereus* es el más comúnmente encontrado en leche y productos lácteos (Janstová et al. 2006). Es considerado un microorganismo termodúrico, dado que sus esporas pueden sobrevivir a los procesamientos térmicos utilizados en la industria (Cronin y Wilkinson, 2008). Además algunas especies se pueden multiplicar a temperaturas de refrigeración por lo que también es considerado un microorganismo psicrótrofo (Zhou et al. 2010). *Bacillus spp.* produce proteasas y lipasas extracelulares y fosfolipasas (lecitinasa) resistentes a los tratamientos térmicos, comparables con las enzimas producidas por *Pseudomonas* (Meer et al. 1991). La combinación de estas características en una especie microbiana denota un gran potencial deteriorante (Matta y Punji, 1999). La contaminación de leche cruda por esporas de *B. cereus* han sido relatadas como la principal causa de la presencia de éstos microorganismos en leches procesadas (Svensson

et al. 2004). Las esporas de los microorganismos termodúricos pueden encontrarse en productos procesados, como leche pasteurizada y crema almacenada, disminuyendo su vida útil (Hill et al. 2012, Griffiths, 1992). Para asegurar la vida útil de la leche pasteurizada, es necesario que cumpla con un límite máximo de esporas de *B. cereus* de 3 esporas/ml log (Walstra et al. 2001). En los productos deshidratados adquieren principal importancia, debido al efecto de la concentración. Además al tener prolongada vida útil, estos productos son los más propensos al deterioro causado por estos microorganismos (Buehner et al. 2014).

Como se mencionó anteriormente, a nivel internacional las industrias han incorporado para calificar y bonificar la leche por su calidad, otros parámetros como recuento de psicrótrofos, termodúricos, aislamientos de *S. aureus* entre otros (Gillespie et al. 2012). Mientras que la reglamentación de Uruguay sólo toma en cuenta RCS y recuento bacteriano. Por lo tanto, psicrótrofos y termodúricos son de gran importancia en la calidad de la leche que va a ser industrializada principalmente por sus efectos sobre la composición. Las enzimas lipolíticas y proteolíticas que ellos producen causan deterioro durante el almacenamiento de la leche y productos lácteos (Jay et al. 2005). Gebrte-Egziabher et al. (1980), señalan que estas proteasas encontradas en la leche cruda, son producidas por bacterias psicrótrofas, en especial del género *Pseudomonas*. Fajardo-Lira et al. (2000), demostraron que estos microorganismos crecieron en leche cruda a 7ºC por 3 días. Además observaron producción de proteasas extracelulares que causan un aumento en la actividad de la plasmina, hidrolizando la caseína y disminuyendo los niveles de la misma (recuento por encima de 10^7 ufc/ml). Este aumento en la actividad de la plasmina podría afectar la calidad de los quesos u otros subproductos de la leche. En el caso de los termodúricos, se ha reportado que *B. cereus* también puede liberar proteasas que degradan la caseína deteriorando la leche. La κ-caseína es la fracción proteica más afectada por la hidrólisis. Luego de 7 días de almacenamiento a 20°C toda la κ caseína es convertida a para-κ-caseína, mientras que β-caseína se reduce un 70%. Además como parte del deterioro que causa este microorganismo en la leche, se ha observado que libera péptidos de bajo peso molecular causando sabores indeseables en leche (Janstová et al. 2006).

2.1.2.1 Factores de variación de la calidad higiénica de la leche

En relación al recuento de mesófilos, existen varios estudios que afirman que el efecto estacional es de gran significancia en la producción de leche de calidad en cuanto a su higiene (Cziszter et al. 2012). Elmoslemany et al. (2010), en Canadá, determinaron que los altos recuentos de bacterias en verano y primavera están relacionados a temperaturas ambientales más altas que favorecen la rápida multiplicación bacteriana. Algunos autores demostraron que el recuento bacteriano total en la leche de tanque estaba influenciado por los procedimientos en la rutina de ordeñe. Esto incluye la

implementación y mantenimiento de prácticas de limpieza y desinfección tanto del equipo de lechería como también la utilización de pre sellado y post sellado, los cuales influyen significativamente en la mejora de la calidad de la leche (Zucali et al. 2011). Aunque para recuentos por debajo de 50000 ufc/ml lo que más influye es la higiene. Elmoslemany et al. (2010), encontraron que existe una asociación entre la higiene de la ubre y el recuento bacteriano en la leche de tanque, ya que el grado de suciedad de las ubres pre ordeñe estaba positivamente asociado al recuento bacteriano total y al recuento de psicrótrofos en la leche de tanque. Al igual que para el recuento bacteriano, estos autores, encontraron que un factor de riesgo asociado al aumento de psicrótrofos en leche de tanque es la higiene de la ubre pre ordeñe. Además obtuvieron recuentos más altos de estos microorganismos en la primavera y determinaron que las variaciones estacionales eran influenciadas tanto por las prácticas en la rutina de ordeñe, el ambiente y la higiene de las vacas. En este sentido, Keefe (2012), afirma que el secado de las tetas es una "regla de oro" en la rutina de ordeñe, porque remueven la materia orgánica y el desinfectante pre ordeñe de la piel de la ubre y pezones y produce además una buena estimulación para el mecanismo de bajada de la leche. *Bacillus cereus* puede llegar a la leche desde el medio ambiente del establecimiento o por una recontaminación durante los procesos en la industria (Lin et al. 1998; Svensson et al. 2000). En el establecimiento, la leche de tanque puede ser contaminada por esporas de *B. cereus* desde el alimento, suelo, pezones sucios o superficie de los equipos de ordeño (Slaghuis et al. 1997). El origen de estos microorganismos puede ser diferente según el sistema productivo y el manejo de los animales. Estos autores en trabajos realizados en Suecia, reportaron que en pastoreo la contaminación por el suelo es dominante, mientras que en los animales estabulados la principal fuente son los alimentos concentrados. Además, el agua residual del lavado de los equipos y el material de la cama en animales confinados también puede ser una importante fuente de contaminación (Magnusson et al. 2007). Es importante destacar que la concentración de este microorganismo puede incrementarse luego de la contaminación inicial, durante un incorrecto almacenamiento de la leche en el establecimiento (Vissers et al. 2007), debido al tiempo y temperatura de almacenamiento de la leche en el tanque que favorecen su multiplicación (Svensson et al. 2004). Por otro lado, *B. cereus* presenta la capacidad de producir biofilm en las superficies de los equipos utilizados en el establecimiento y en la industria, siendo difícilmente removido por los procedimientos de limpieza de rutina (Shaheen et al. 2010). En relación a la variación estacional, Maziero y Bersot (2011), reportan mayor incidencia de *B. cereus* en leche y productos lácteos en verano y primavera. En este sentido, Te Giffel et al. (1995), reportan la mayor concentración de este microorganismo en verano y temprano otoño. Algunos atribuyen este aumento al manejo durante el verano, al aumentar el tiempo de pastoreo, se

incrementa la exposición de las ubres a la suciedad del suelo, y por tanto la contaminación (Slaghuis et al. 1997). Por otro lado, la contaminación en la leche también puede ocurrir en animales estabulados, siendo en este caso el material de cama, material fecal, alimento, aire y equipamiento de ordeñe las principales fuentes de contaminación (Christiansson et al. 1999). En este sentido, fue reportada una correlación positiva entre las esporas *de B. cereus* de alimentos concentrados y heces con las halladas en la leche (Magnusson et al. 2007).

La influencia de la rutina de ordeñe en la calidad higiénica de la leche está estrechamente relacionada al tipo de sistema de producción y a la rutina utilizada. Es de destacar que la mayoría de los trabajos están hechos en sistemas de producción con largos períodos de estabulación y rutinas "completas" (pre sellado, secado luego del lavado, despunte y post sellado).

2.2 CASEINA Y FRACCIONES DE CASEINA EN LECHE

La leche bovina juega un papel central en la nutrición humana, determinado por los aspectos nutricionales de sus componentes (Bauman et al. 2006). La leche está constituida en su mayoría por agua (85,3 - 88,5%), lactosa (3,8 - 5,3%), proteína (2,3 - 4,4 %), grasa (2,5 - 5,5%), minerales y vitaminas (Walstra et al. 2006). Su relevancia nutricional radica fundamentalmente en la fracción lipídica formada principalmente por ácidos grasos saturados y la fracción proteica donde se distinguen las caseínas (Walstra et al. 2001).

2.2.1 Síntesis de caseína en la glándula mamaria

Las caseínas se sintetizan en las células secretoras de la glándula mamaria agrupadas en forma de alvéolos conectados al tejido ductal. Son células epiteliales que poseen características biosintéticas y secretorias especializadas, con numerosas mitocondrias, una extensa red de retículo endoplásmico rugoso, y un aparato de Golgi bien desarrollado. Se secretan, en estructuras llamadas micelas de caseína y se encuentran yuxtapuestos a la membrana apical de estas células. Las células epiteliales secretoras están rodeadas por una capa de células mioepiteliales, las cuales se pueden contraer y liberar leche en los conductos en respuesta a la oxitocina (Farell et al. 2006). Las caseínas son las principales proteínas de la leche constituyendo el 80% del total de las mismas. Son un complejo de proteínas presentes en la leche en forma de micelas que contienen calcio, fosfato, magnesio y citrato (estos dos últimos en pequeñas cantidades) y se caracterizan por precipitar a pH de 4,6 (Walstra et al. 2001). Los aminoácidos luego que se incorporan en las células epiteliales se utilizan para la síntesis de las caseínas en los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso (Farell et al. 2006, Maas et al. 1997). Luego son transportadas a través del aparato de Golgi donde se fosforilan y se forman las micelas, las que se secretan desde la membrana apical de la célula a la luz del alvéolo vía exocitosis (Maas et al. 1997). Las caseínas están compuestas por 4

familias, αs1, αs2, β y κ caseína. La micela de caseína está formada por submicelas, con un diámetro que fluctua entre 30 – 300 nm (Fox y McSweeney, 2013). Los enlaces entre las submicelas resultan de una interacción electrostática entre los grupos fosfatos de α-caseína y β-caseína con los iones calcio. De esta manera se unen las submicelas directamente, o en cadenas en donde se incorpora fosfato y citrato formando la micela de caseína. La agregación de submicelas se producirá hasta que la superficie de la micela se encuentre rodeada de κ-caseína, generando una repulsión estérica. La κ-caseína poco fosforilada, muy polar e incapaz de fijar calcio se ubica formando una especie de "casquete". Esta fracción es la de mayor importancia en la industria quesera ya que es sobre ésta que actúa el "cuajo" (quimosina o renina) produciéndose la coagulación. La interacción de κ-caseína con las fracciones de α y β-caseína, genera que todo el complejo formado sea estable y no precipite en presencia de iones calcio presentes en la leche en pequeña proporción (Walstra et al. 2001). Las características de las micelas de caseína tienen gran influencia en la conducta de la leche y los productos lácteos durante el procesamiento industrial (Scott, 1991). El contenido de calcio y fósforo junto con las caseínas cumplen un papel muy importante en la capacidad coagulativa de la leche teniendo de esta manera un pronunciado efecto sobre la elaboración de los productos lácteos (Faka et al. 2009). Esto es debido a que estos minerales serán parte constitutiva de la cuajada y que el Ca^{2+} principalmente, cumple un importante rol en la actividad enzimática durante la coagulación. Como se dijo anteriormente, la caseínas influyen directamente en la aptitud que tiene la leche para ser coagulada por el cuajo (Walstra et al. 2001). En la elaboración del queso, durante el proceso de coagulación enzimática la fracción κ-caseína constituye el blanco de la enzima renina, actuando entre el aminoácido 105 (fenilalanina) y el 106 (metionina). La especificidad de esta reacción es un factor muy importante que influye en el rendimiento quesero. Por no precipitar en presencia de Ca^{2+}, su ubicación en la micela de caseína y sus características hidrófilas, la k caseína es de gran importancia en la leche debido a que actúa como estabilizadora de la caseínas αs1, αs 2 y β caseína (Scott, 1991). Más allá de la amplia variación que pueden tener la caseína y sus fracciones en leche, en el cuadro II, se muestra un promedio general de su contenido en leche bovina.

Cuadro II: Composición de las fracciones de caseína de la leche

Componente	Promedio (g/kg)	Valor relativo (%)
Caseína(CN)	25	76,2
caseína αS1 (αS1CN)	9	36
caseína αS2 (αS2CN)	2,5	10
Caseína β (βCN)	10	40
Caseína κ (κCN)	3,2	14

Adaptado de Alais, (1985)

El tamaño de la micela tiene relación con el rendimiento quesero. Glantz et al. (2010), observaron que un menor tamaño de micela de caseína mejora las propiedades de gelificación, optimizando el paso inicial en el procesamiento del queso. Walstra et al. (2001), afirman que la proporción de κ-caseína varía inversamente con el tamaño de la micela, mientras la β caseína mantiene una relación directa. El tamaño de la micela depende en parte de la presencia del alelo k-CNBB. Se ha observado que cuando hay presencia de este alelo existe un 40% más de micelas pequeñas en comparación con el alelo K-CN AA (FIL-IDF, 1993). Además del componente genético, existen otros factores que influyen en el tamaño de la micela como alimentación, pH, contenido de calcio en la leche (Devold et al. 2000) y estacionalidad (Pires, 1999).

2.2.2 Factores de variación de la composición de la leche

El valor nutricional de la leche está influenciado por múltiples factores como la estación, el estado de lactación, alimentación, salud de la glándula mamaria, factores genéticos (Forsbäck et al. 2010; Heck et al. 2009; Harmon, 1994). Según Auldist et al. (1996), los factores que ejercen una influencia significativa sobre la composición de la leche son factores: a) genéticos asociados a las distintas razas lecheras, b) nutricionales asociados con la disponibilidad estacional y cambiante de la calidad de la pastura a lo largo del año, c) fisiológicos asociados con la etapa de lactación d) patológicos relacionados con la incidencia de mastitis y otras enfermedades. La alimentación y el manejo de los rebaños lecheros producen cambios observables a corto plazo en la composición de la leche (Sutton y Morant, 1989). Mientras que el mejoramiento genético de los rebaños lecheros también tiene un efecto positivo sobre la concentración de sólidos lácteos, pero su efecto se observa a largo plazo (Dillon et al. 2006).

2.2.2.1 Efecto de la estacionalidad y la alimentación sobre la composición de la leche

Los cambios de las condiciones climáticas a lo largo del año afectan el volumen y la composición nutricional de la leche. Heck et al. (2009), reportaron una menor concentración de grasa y proteína láctea en leche en verano en comparación con invierno, debido a las diferentes temperaturas y composición de los alimentos (Fox y McSweeney, 2013). Ozrenk y Selcuk (2008), registraron una correlación inversamente proporcional entre la temperatura ambiental y la cantidad de leche, grasa y proteína producidas. El DairyCo (2013), informó que en los años 2009 a 2013, los niveles de grasa en el Reino Unido disminuyeron gradualmente en invierno, primavera y verano, seguidos por un gran aumento, superando 4,20% en otoño y se mantuvieron constantes en otoño e invierno. El contenido de proteína siguió una tendencia similar pero con menos variación (Chen et al. 2014). Ozrenk y Selcuk (2008), quienes evaluaron el efecto de la estación sobre la composición de la leche reportan porcentajes de grasa y proteína altos durante el invierno (3,1% para grasa y 2,9% para proteína) y bajos durante el verano (2,3% materia grasa y 2,7% fracción proteica). En Uruguay, las concentraciones medias de grasa y proteínas (%) según el promedio nacional, son superiores en otoño e invierno en comparación con las estaciones de primavera-verano (Delucchi et al. 2008). Es claro que la estacionalidad tiene un efecto importante en la producción y en la composición de la leche. Por lo que la leche producida puede ser más adecuada para la fabricación de determinados productos en diferentes épocas del año (Chen et al. 2014). Estos autores registaron mayores porcentajes de grasa y proteína en otoño en comparación con verano, modificando sus propiedades tecnológicas. En el caso de la industria quesera la variación estacional de la composición de la leche causa problemas en la manufactura de los productos (Murphy y O´Brien, 1997). Por ejemplo, al modificarse la composición de la leche, se pueden alterar los tiempos de coagulación, resultando en la interrupción de la producción o el fracaso para formar la cuajada (Scott, 1991).

Los factores climáticos tienen una influencia directa sobre los sistemas de producción de la leche y por lo tanto, en la alimentación. En sistemas pastoriles, la producción y calidad de forraje varía a lo largo del año, lo que se ve reflejado en la composición de la leche (Cavache y Navas, 2012). La alimentación de la vaca lechera constituye una vía rápida para modificar los componentes de la leche; sin embargo, existe una compleja relación entre ésta y los componentes del alimento (Sutton y Morant, 1989; Gallardo, 2006). El sistema de producción y los componentes de la dieta suministrada van a establecer los diferentes efectos que tendrá la alimentación sobre la

composición de la leche (Rearte, 1992). Existen trabajos en Uruguay que han demostrado la influencia de la alimentación sobre el contenido de sólidos de la leche (Acosta, 2002).

Para llevar a cabo la síntesis de la proteina láctea, los rumiantes disponen de dos fuentes principales de suministro de aminoácidos, la proteína de origen microbiano sintetizada en rumen, y la proteína del alimento que se digiere en intestino. Este proceso tiene además una exigente demanda de energía, que es suplida por la glucosa y el ácido acético proveniente de la fermentación ruminal. En este sentido, se ha reportado que entre un 35% y un 90% de la energía que usa un rumiante proviene de la digestión de fuentes fibrosas, para lo cual se requieren poblaciones bacterianas numerosas y activas en el rumen (Mendoza, 2010). La síntesis de proteína que se lleva a cabo en la glándula mamaria dependerá del suministro de aminoácidos y de la energía disponible (DePeters y Ferguson, 1992). La principal fuente de estos aminoácidos es la proteína que llega al duodeno, la cual está representada en un 40-60 % por proteína de origen microbiano (NRC, 2001). La energía de la dieta puede ser incrementada con el consumo de concentrado o mejorando la calidad del forraje (Gallardo, 2006). Bargo et al. (2003) en experimentos en pastoreo, reportaron que tanto su producción como el porcentaje de proteína se incrementaron a medida que se incluyeron concentrados en la dieta (+0,1 g/L de leche y +10 g/día por kg de concentrado extra, respectivamente). Al aumentar los concentrados se obtienen altos niveles de propionato a nivel ruminal, favoreciendo la gluconeogénesis en el hígado a partir de dicho metabolito. Esto reduce la gluconeogénesis a partir de aminoácidos, quedando éstos disponibles en mayor cantidad para ser usados en la glándula mamaria en la síntesis de proteína láctea (Rearte, 1992). Aumentos en el suministro de energía favorecen a su vez la síntesis de proteína microbiana a nivel ruminal y el suministro de aminoácidos en la glándula mamaria (Astigarraga, 2003). Por otro lado, el nivel de proteína cruda de la dieta afecta más a la producción de leche (volumen) que la concentración de proteína en la misma. Excepto en el caso en que los niveles de proteína en la dieta sean muy bajos que depriman la concentración de la proteína en leche a causa de una reducción en la digestibilidad y el consumo total de alimentos (Acosta, 2002). Coulon y Verdier (1995) señalaron que un incremento de nitrógeno no proteico (nnp) en la dieta, induce simultáneamente a aumentos en el rendimiento de leche y secreción de la proteína.

2.2.2.2 Otros factores que afectan la composición de la leche

La composición de la leche varía según la etapa de la lactancia. La producción de leche aumenta rápidamente desde el parto llegando al pico de producción a las 6 u 8 semanas de producción. El porcentaje de grasa y proteína parte con un nivel alto en leche y a medida que aumenta la

producción de leche los porcentajes de proteína y grasa disminuyen en relación inversamente proporcional al volumen de leche (Silvestre et al. 2009). Auldist et al. (1996), al evaluar la influencia de la estación y el estado de lactancia sobre la composición de leche bovina, encontraron diferencias entre el estado de lactancia y la época del año, siendo mayores las concentraciones de grasa y proteína al final que en el principio de la lactancia, y de igual forma, las concentraciones de grasa y proteína fueron mayores en invierno en comparación con el verano

En Uruguay como se mencionó anteriormente la composición de la leche principalmente proteína aumenta en invierno-otoño y disminuyen en verano y primavera. Por otro lado, resulta importante resaltar los valores porcentuales durante el verano ya que en ese momento la mayoría de los rodeos están al final de la lactancia y no sólo varía la cantidad sino la calidad de la grasa (tipos de ácidos grasos) y la proteína (fracciones de caseína principalmente) (Delucchi et al. 2008).

La génetica del animal, influye en la composición de la leche. El rendimiento lechero, entendiendo éste como producción de leche y calidad lechera (en este caso en base a proteínas), está influído por la genética del animal y por los efectos del medio ambiente. La genética le da a la vaca la oportunidad de producir leche de una determinada calidad; el medio ambiente provee las condiciones para producirla. Por lo tanto, el rendimiento es el resultado de la combinación de la genética con el medio ambiente, así como la interacción entre estos dos factores (Requena et al. 2007).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Caracterizar la leche a nivel de tanques de 29 establecimientos de la región litoral norte, generará información sobre la calidad de la leche remitida a las principales plantas lecheras de la región y de su variación en las diferentes estaciones del año. Además permitirá conocer el efecto del tiempo de almacenamiento en frío y el tamaño del rodeo sobre las variables de calidad higiénico-sanitaria de la leche remitida. Este trabajo le aportará a la industria información muy importante en cuanto a la variación estacional de parámetros de calidad higiénico-sanitaria (en especial, recuento de psicrótrofos, termodúricos y *S. aureus y* recuento celular), y de composición (porcentajes de caseína y fracciones de caseína) a lo largo del año, que hasta ahora no se conocen en la región. De esta manera la industria podrá conocer más sobre la calidad higiénico-sanitaria de sus establecimientos remitentes y establecer planes conjuntos con el sector primario para adecuar la calidad de la leche producida a sus necesidades de industrialización y comercialización. Muchos países utilizan en su reglamentación parámetros como recuento de psicrótrofos y termodúricos como complemento para evaluar la calidad higiénico-sanitaria de la leche, además del RCS y del recuento bacteriano. De esta manera, la industria aumenta las exigencias en el control de calidad de la leche asegurándose contar con materia prima de excelente aptitud para las líneas de productos a elaborar. Eso adquiere principal importancia cuando se elaboran quesos o productos concentrados. Sin embargo en Uruguay y particularmente en la región, no existe información sobre la variación del perfil microbiológico ni del RCS en leche de tanque durante las estaciones del año. Esta información es de gran utilidad para las industrias de la región dado que elaboran principalmente queso (principal producto de exportación) y productos con alto tratamiento térmico (concentrados) como por ejemplo suero en polvo. En cuanto a la información generada sobre la variación estacional de caseína y fracciones, la industria podrá destinar la leche para la elaboración de quesos de forma diferencial según la calidad de la misma en las diferentes estaciones del año. Este trabajo a su vez aporta información original a nivel nacional e internacional, sobre la variación de la calidad higiénico-sanitaria, principalmente psicrótrofos y termodúricos, según tamaño del rodeo, tiempo de almacenamiento en tanque y sus interacciones con la estacionalidad. De esa manera se genera información de cómo se afectan estas variables en las estaciones según caracteristicas de los establecimientos a nivel de producción primaria. Por otro lado, es conocido que todas estas variables están ligadas estrechamente al manejo y por lo tanto al sistema productivo siendo importante estudiarlas en establecimientos que reflejan las condiciones de producción lechera de Uruguay.

4. HIPÓTESIS

La estacionalidad afecta la calidad higiénico-sanitaria, caseína y fracciones de caseína de la leche de tanque.

El tiempo de almacenamiento en frío y el tamaño del rodeo afectan la calidad higiénico-sanitaria de la leche de tanque.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVOS GENERALES

Caracterizar en las diferentes estaciones del año la leche producida en predios de la región litoral norte del Uruguay en base a la calidad higiénico-sanitaria, porcentaje de caseína total y fracciones de caseína en leche de tanque.

Evaluar tiempo de almacenamiento en frío y tamaño del rodeo sobre los parámetros de calidad higiénico-sanitaria en leche de tanque.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudiar la variación estacional de la calidad higiénica (recuento bacteriano, psicrótrofos, termodúricos, aislamientos de *Pseudomonas*) y calidad sanitaria *(S. aureus* y recuento de células somáticas) en leche de tanque de 29 predios de la región litoral norte del país

Caracterizar los predios estudiados a lo largo del año de acuerdo al recuento de células somáticas en leche de tanque

Estudiar el efecto del tiempo de almacenamiento en frío y del tamaño del rodeo sobre la calidad higiénico-sanitaria

Evaluar la caseína total y fracciones de caseína en las diferentes estaciones, durante un año de estudio

6. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó desde abril de 2012 a marzo 2013 en los Departamentos de Río Negro y Paysandú, con muestras de leche de 29 productores remitentes a dos de las industrias lácteas principales de la región.

6.1 Diseño experimental: selección de los establecimientos

Los establecimientos fueron seleccionados en base a variables de tamaño, nivel tecnológico e intensificación del sistema productivo del año anterior, mediante un diseño de muestreo denominado: muestreo aleatorio estratificado. Este muestreo consistió en la división previa de la población de estudio, en grupos o clases homogéneos (estratos), respecto a la característica a estudiar (producción de leche). A cada uno de estos establecimientos se le asignó un número seleccionándose al azar dentro de cada estrato. Se hizo un muestreo aleatorio estratificado el cual consistió en 2 etapas. En una primera instancia a cada establecimiento se le asignó un estrato (categoría), luego se realizó un sorteo, y en base a éste se seleccionaron (en forma dirigida) 10 establecimientos para cada grupo (respetando el orden del sorteo y la ubicación geográfica). Los estratos para seleccionar los establecimientos se dividieron según la producción mensual del año anterior en hasta 50000 litros mensuales (estrato 1), de 50000 a 200000 litros (estrato 2) y mayor a 200000 litros (estrato 3).

6.2 Estratos y categorías según estación, tamaño del rodeo y tiempo de almacenamiento en tanque.

6.2.1 Efecto estacional

Las variaciones estacionales en leche cruda fueron categorizadas en 4 grupos: 1: otoño (marzo, abril y mayo); 2: invierno (junio, julio, agosto); 3: primavera (setiembre, octubre) y 4: verano (noviembre, diciembre, enero, febrero) en base a registros de Índices de temperatura y humedad (ITH) del año 2011 en la región estudiada (INIA Salto Grande, 2012).

6.2.2 Tamaño del rodeo

Los establecimientos se caracterizaron según tamaño del rodeo (número de vacas en ordeñe: VO) en 4 estratos, según la clasificación reportada por Oleggini (2001): Estrato 1: menos de 50 vacas VO, Estrato 2: entre 51 y 100 VO, Estrato 3: entre 101 y 250 VO Estrato 4: mayor a 250 VO.

6.2.3 Tiempo de almacenamiento en frío

Para analizar el tiempo de almacenamiento en tanque de frío (AT), las muestras se dividieron en dos grupos según tiempo de almacenamiento. Desde el ordeño hasta la recolección por parte de la industria. AT1: hasta 24 horas de almacenamiento (2 ordeños), AT2: hasta 48horas de almacenamiento (4 ordeños). Estos tiempos se determinaron según el momento del retiro de la leche de los establecimientos por parte de la industria.

6.2.4 Relevamiento de datos del establecimiento

En cada visita se relevaron datos sobre alimentación y variables del establecimiento como número de vacas en ordeñe, número de tanques de frío, tiempo de almacenamiento en tanque, temperatura y capacidad del tanque.

6.3 Datos del ambiente y alimentación (concentrado y ensilaje) de los establecimientos estudiados, durante el período de estudio

6.3.1 Cálculo del Índice de temperatura y humedad (ITH)

En base a los registros de temperatura y humedad obtenidos de la estación de INIA Salto de los días que se llevaron a cabo los muestreos de leche en los establecimientos durante los meses de abril de 2012 a marzo de 2013, se calculó el índice de ITH. La fórmula utilizada fue la siguiente: $(1,8 \times at + 32) - (0,55 - 0,55 \times RH) \times [(1,8 \times at + 32) - 58]$, donde RT corresponde a la humedad relativa y at a la temperatura ambiente (grados celsius) (Vitali et al. 2009, citada por Bernabucci et al. 2015). Los datos se muestras en la Tabla 1.

Tabla 1. Índice de temperatura y humedad (promedio, máximo y mínimo) registrada durante el año de estudio (2012-2013).

	ITH promedio diario	ITH máx	ITH min
Abril	63,89	68,64	58,96
Mayo	56,89	64,03	50,55
Junio	55,42	60,59	50,50
Julio	50,73	56,82	46,14
Agosto	56,48	63,37	49,14
Setiembre	59,44	63,87	56,56
Octubre	58,62	60,26	56,98
Noviembre	61,09	65,02	59,12
Diciembre	62,89	67,06	58,95
Enero	67,12	71,84	54,46
Febrero	68,68	72,34	65,25
Marzo	61,92	65,93	58,05

6.3.2. Suplemento utilizado en cada estación

En la Tabla 2, se observa el promedio de suplemento suministrado en cada estación en el total de los establecimientos. Este dato se obtuvo mediante la encuesta realizada al productor, en cada visita mensual al momento de la toma de muestras de leche.

Tabla 2. Suministro de reservas y concentrados en las estaciones del año de estudio (media de los 29 establecimientos estudiados, en cada estación)

Variable	Otoño	Invierno	Primavera	Verano
Concentrado	7,4±2,66	6,3±2,33	6,10±2,50	5,88±2,58
Ensilaje	10,65±9,5	5,93±9,88	4,34±6,66	7,55±9,93

*kgBF/vo/día (BF: base fresca).

6.4 Obtención de las muestras de leche

El muestreo se realizó mensualmente durante el período de un año desde abril de 2012 a marzo 2013. En cada visita se obtuvieron muestras del tanque de frío, tomadas asépticamente mediante la metodología descripta por FIL-IDF 50C:1995 (Pinto et al.1998). Se realizó recuento bacteriano, recuento de células somáticas, composición (% de materia grasa, % caseína total y fracciones de caseína). En cada estación se obtuvo una muestra en forma aséptica, para la determinación del perfil microbiológico de tanque (recuento de psicrótrofos, termodúricos y *Pseudomonas* y *Staphylococcus aureus*).

6.5 Análisis de laboratorio

6.5.1 Análisis microbiológicos en leche

Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Calidad de Leche del Departamento de Ciencia y Tecnología de la Leche, Facultad de Veterinaria. El Recuento de mesófilos aerobios totales (RMAT) se realizó en el Laboratorio de Calidad de Leche de INIA “La Estanzuela”.

6.5.1.1. Recuento bacteriano

Recuento de mesófilos aerobios en leche (RMAT) realizado según FIL100B (1991): Método Standard en Placas de Agar– Leche y Productos Lácteos. Consiste en la siembra e inoculación en placas que ya vienen preparadas con un medio de cultivo específico con nutrientes estándares, un agente gelificante en agua fría y un indicador tetrazolium que facilita la visualización de las colonias. Se incubaron por 48 hs ± 3 hs a 32 ± 1 °C (Métodos oficiales AOAC 986.33. Método de lámina rehidratable para recuento de bacterias y coliformes en leche y 989.10 Método de lámina rehidratable para recuento de bacterias y coliformes en productos lácteos).

6.5.1.2 Recuento de microorganismos psicrótrofos

Realizado según APHA (2001), las muestras se sembraron en superficie en medio de cultivo TSA (Tripticasa Soya Agar) a una temperatura de 7ºC durante 10 días.

6.5.1.3 Recuento de *Pseudomonas*

Se utilizó Pseudomonas Agar Base (Oxoid, CM 0559) y se suplementó con Pseudomonas C-F-C supplement (Oxoid SR 0103E). Según metodología descripta en APHA, (2001) las colonias presuntivas se pasaron a agar leche, donde la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* es reconocida por presentar un halo claro alrededor de la colonia, el cual corresponde a la hidrólisis de la caseína.

6.5.1.4 Recuento de S*taphylococcus* coagulasa positiva

Se realizó según la metodología descripta por APHA (2001), donde se identifican las colonias de éste utilizando Baird Parker Agar Base (Himedia, M043-500G) las que se confirmaron mediante ensayos bioquímicos: test de la catalasa y test de la coagulasa. Se utilizó la prueba de la coagulasa como prueba definitiva en su identificación. La misma se produce por la mezcla de una suspensión de la cepa de *Staphylococcus* a estudiar con plasma de conejo en la cual el fibrinógeno del plasma de conejo se convierte en fibrina por la acción de la coagulasa. Una prueba positiva es indicada por la formación de un coágulo en el tubo tras la incubación a 37ºC durante 24 horas (Quinn, 2008).

6.5.2 Análisis de composición y RCS en leche

6.5.2.1 Porcentaje de caseína (%)

Los análisis para la determinación de la composición de la leche (materia grasa y caseína total) se realizaron mediante los siguientes equipos: Milko-Scan 104 A/B – Foss Electric Denmark año 1992 y Analizador MilkoScan FT – FOSS, ubicados en el Laboratorio de Calidad de leche de INIA-La Estanzuela.

6.5.2.2 Fracciones de caseína (% αCN, βCN y κCN)

Se determinó el contenido de α, ß y k caseína por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase reversa (Fase móvil polar), empleando detector PDA y extracción de cromatograma a λ=222 nm, por porcentaje relativo de áreas. (Bonizzi et al. 2009).

6.5.2.3 Análisis recuento de células somáticas (RCS)

La determinación del Recuento de células somáticas (RCS) se realizó en el Laboratorio de Calidad de Leche de INIA “La Estanzuela” utilizando un equipo de recuento de células de fluoro-opto-electronic denominado *Somacount 500.* Bentley Instruments, Inc. USA año 1998.

6.6 Análisis estadístico

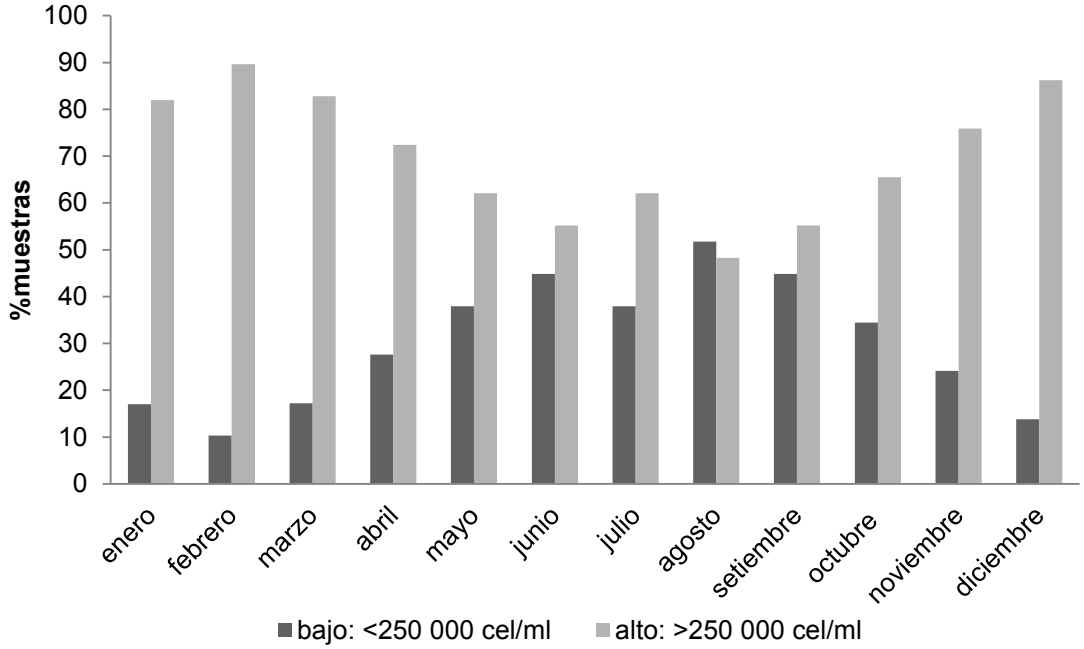
Las variables de calidad higiénico-sanitaria y de composición fueron analizadas por ANOVA para mediciones repetidas incluyendo como efecto fijo la estación. Para las variables de calidad higiénico-sanitaria además de la estación se incluyeron como efecto fijo tamaño del rodeo y tiempo de almacenamiento y se estudió la interacción entre: estación- tamaño del rodeo y estación- tiempo de almacenamiento. Los resultados son expresados como la media ± desvío estándar. Las variables de recuento de células somáticas, recuento bacteriano, recuento de psicrótrofos y termodúricos (cél/ml y ufc/ml) se transformaron en log en base 10 para normalizar su distribución y posteriormente ser analizadas estadísticamente. Se consideró diferencia significativa con un $\alpha < 0,05$.

7. RESULTADOS

7.1 CARACTERIZACIÓN DEL RCS Y EFECTO DE LA ESTACIÓN SOBRE LAS VARIABLES DE CALIDAD

7.1.1 Calidad sanitaria: RCS y *S. aureus*

En la Gráfica 1 se muestra que en la mayoría de los meses de año de estudio (excepto el mes de agosto), el promedio mensual de RCS de leche de tanque de todos los establecimientos estudiados se mantuvo por encima de 250000 cél/ml.



Gráfica 1: Porcentaje de muestras a lo largo del año con bajo y alto recuentos de células somáticas (RCS). RCS Bajo: <250 000 cél/ml y RCS alto: >250 000 cél/ml.

Se encontró efecto de la estación sobre el RCS ($p<0,0001$): observándose una disminución en el RCS desde el otoño al invierno ($p<0,0001$) y un aumento desde el invierno al verano ($p<0,0001$) (Tabla 3). En invierno se registraron los valores más bajos de RCS, mientras que verano fue la estación donde se presentaron los mayores niveles. *Staphylococcus aureus* aislados de leche de tanque de frío cambió acorde a la estación ($p=0,0047$). En verano fue donde se observaron los mayores aislamientos de *S. aureus* en relación al resto de las estaciones ($p<0,001$) (Tabla 3).

Tabla 3. Recuento de células somáticas (RCS) (cél/ml) y *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (ufc/ml) (media ± ds) de tanque de frío de 29 establecimientos lecheros en las diferentes estaciones del año.

	Otoño	Invierno	Primavera	Verano
RCS	364034[a] ±33783	321045[b] ±36202	341190[ab] ±44932	387819[c] ±34601
S. aureus	553,89[a] ±294,14	498,40[a] ±289,79	628,65[a] ±278,88	1687,11[b] ±287,37

Medias con letras distintas existe diferencia significativa (p<0,05). RCS: n=348 (Otoño: n=87, Invierno: n=87, Primavera: n=58, Verano: n=116). *S. aureus:* n=116 (Otoño: n=29, Invierno: n=29, Primavera: n=29, Verano: n=29).

7.1.2 Calidad higiénica: recuento bacteriano, psicrótrofos, termodúricos y aislamientos de *Pseudomonas*

En la Tabla 4 se muestra el efecto de la estación del año sobre los microorganismos de leche de tanque. Se encontró efecto estacional sobre psicrótrofos (p<0,0001), *Pseudomonas* (<0.0001) y termodúricos (p=0,011), mientras que para el recuento bacteriano no se observó diferencia estacional. Se registró un aumento significativo desde el otoño al verano para los recuentos de psicrótrofos (p<0,0001), *Pseudomonas* (p<0,001) y termodúricos (p=0,0044).

Tabla 4. Recuento bacteriano, psicrótrofos, termodúricos y aislamientos de *Pseudomonas* (ufc/ml) (media ± ds) de tanque de frío de 29 establecimientos lecheros en las diferentes estaciones del año

	Otoño	Invierno	Primavera	Verano
Recuento bacteriano	30873,00[a] ±6684,96	2138,00[a] ±6608,28	29059,00[a] ±7308,69	34388,00[a] ±6122,58
Psicrótrofos	499,11[a] ±5721,88	4399,35[a] ±5528,60	7898,22[b] ±5420,24	21384,00[b] ±5587,85
Pseudomonas	14,21[a] ±173,35	53,89[ab] ±167,41	365,76[b] ±164,10	440,94[b] ±169,24
Termodúricos	2135,09 [a] ±1397,46	2651,45[a] ±1349,81	2520,77[b] ±1323,71	4881,97[b] ±1364,47

Medias con letras distintas existe diferencia significativa (p<0,05). Recuento bacteriano: n=348 (Otoño: n=87, Invierno: n=87, Primavera: n=58, Verano: n=116). Psicrótrofos, termodúricos y aislamientos de *Pseudomonas:* n=116 (Otoño: n=29, Invierno: n=29, Primavera: n=29, Verano: n=29)

7.1.3 Composición de la leche

Los efectos de estacionalidad sobre la caseína y fracciones de caseína se presentan en la Tabla 5. Se observó efecto de la estación en las variables de caseína total, α caseína, β caseína y k caseína (p<0,0001). La caseína total, α y κ caseína disminuyeron del otoño a la primavera (p=0,005) y continuaron disminuyendo hacia el verano (p=0,005). Los porcentajes de β caseína disminuyeron del otoño al verano (p<0,0001), no encontrándose diferencias entre otoño, primavera y verano. En relación a la k caseína no se observaron diferencias entre invierno y primavera. En todas las variables de composición se registraron los mayores valores promedio en la estación de otoño y los menores valores en verano (Tabla 5).

Tabla 5**.** Variación estacional en el porcentaje (± ds) de caseína total (CN), α caseína (αCN), β caseína (βCN) y κ caseína (κCN) de la leche, de 29 establecimientos lecheros en las diferentes estaciones del año

	Otoño	Invierno	Primavera	Verano
CN	2,52±0,02^{a}	2,49±0,02^{a}	2,46±0,02^{b}	2,37±0,02^{c}
αCN	1,30±0,01^{a}	1,28±0,01^{ab}	1,27±0,01^{b}	1,23±0,01^{c}
βCN	0,78±0,01^{a}	0,80±0,01^{a}	0,78±0,01^{a}	0,74±0,01^{b}
κCN	0,42±0,00^{a}	0,41±0,00^{b}	0,40±0,01^{b}	0,39± 0,00^{c}

Media con letras diferentes indica diferencia significativa (p<0,05). n=348 (Otoño: n=87, Invierno: n=87, Primavera: n=58, Verano: n=116).

7.1.4 Producción de leche

7.1.4.1 Producción de leche mensual

La Tabla 6 muestra la variación de la producción mensual en las diferentes estaciones del año. La producción de leche mensual cambió de acuerdo a la estación (p<0,001). Se registró un aumento de otoño a primavera (p=0,0008) y luego disminuyó de primavera a verano (p<0,0001), no hubo diferencia entre otoño y verano. La primavera fue la estación del año con mayor producción de leche mensual, mientras que los menores valores se observaron en verano-otoño.

Tabla 6. Variación de la producción de leche mensual (media ± ds) en las estaciones del año de los 29 establecimientos lecheros estudiados

	P. de leche mensual (lts/mes)
Otoño	91960[a] ±20443
Invierno	112527[b] ±20432
Primavera	127888[c] ±20508
Verano	96470[a] ±20376

Media con letra diferentes indica diferencia significativa (p<0,05). n=348 (Otoño: n=87, Invierno: n=87, Primavera: n=58, Verano: n=116).

7.1.4.2 Producción de leche individual

Los valores promedios registrados en cada estación del año relacionados a la producción individual promedio (lts/VO/día) fueron los siguientes: otoño 16,23±0,75; invierno 18,45±0,75; primavera 19,30±0,76 y verano 16,97±0,76. La producción de leche individual cambió de acuerdo a la estación (p<0,001), coincidiendo con lo registrado para la producción mensual. Se registró un aumento de otoño a primavera (p<0,001) para luego disminuir hacia el verano (p<0,001) y disminuir aún más hacia el otoño (p=0,009). En primavera, al igual que para la producción de leche mensual, fue la estación donde se registró el mayor valor de producción lts/VO/día, mientras que en otoño y verano se registraron las menores producciones individuales.

7.2 EFECTO DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO EN TANQUE SOBRE LAS VARIABLES DE CALIDAD

7.2.1 Calidad sanitaria: RCS y *S. aureus*

En la Tabla 7 se muestra el RCS y aislamientos de *S. aureus* de acuerdo al tiempo de almacenamiento en tanque de frío. No se observó efecto del tiempo de almacenamiento para ninguna de las variables de calidad sanitaria estudiadas. No se registró efecto de la interacción entre estación y tiempo de almacenamiento en las variables de calidad sanitarias estudiadas.

Tabla 7. Recuento de células somáticas (RCS) (cél/ml) y *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (log_{10}) (media ± ds) de tanque de frío de 29 establecimientos lecheros según tiempo de almacenamiento en tanque (AT).

	AT1	AT2
RCS	351284±29991[a]	357849±38039[a]
S. aureus	2,12±0,13[a]	2,22±0,26[a]

AT1: 24hs. de almacenamiento en tanque de frío, AT2: 48hs. de almacenamiento en tanque de frío. RCS: n=348 (AT1: 301, AT2: 47) y *S. aureus*: n=116 (AT1: 99, AT2: 17).

7.2.2 Calidad higiénica: recuento bacteriano, psicrótrofos, termodúricos y *Pseudomonas*

En la Tabla 8 se muestra los recuentos de microorganismos de leche de acuerdo al tiempo de almacenamiento en tanque de frío. El recuento de psicrótrofos se incrementó con el tiempo de almacenamiento de 24 a 48 hs (p=0,0005), pero no se encontró efecto en el resto de los microorganismos estudiados (Tabla 8). No se registró efecto de la interacción entre estación y tiempo de almacenamiento en las variables de calidad higiénica estudiadas.

Tabla 8. Recuento bacteriano, psicrótrofos, termodúricos y aislamiento de *Pseudomonas* (log_{10}) (media ± ds) de tanque de frío de 29 establecimientos lecheros según tiempo de almacenamiento en tanque (AT).

	AT1	AT 2
Recuento bacteriano	4,22±0,04[a]	4,33±0,06[a]
Psicrótrofos	2,15±0,14[a]	3,39± 0,32[b]
Pseudomonas	1,11±0,08[a]	0,81± 0,20[a]
Termodúricos	2,33±0,11[a]	2,65±0,27[a]

AT1: 24hs. de almacenamiento en tanque de frío, AT2: 48hs. de almacenamiento en tanque de frío. Media con letras diferentes indica diferencia significativa (p<0,05). Recuento bacteriano: n=348 (AT1: 301, AT2: 47) y Psicrótrofos, Termodúricos y *Pseudmonas*: n=116 (AT1: 99, AT2: 17).

7.3 EFECTO DEL TAMAÑO DEL RODEO SOBRE LAS VARIABLES DE CALIDAD HIGIÉNICO SANITARIA

7.3.1. Calidad sanitaria: RCS y *S. aureus*

En la tabla 9 se observa que las variables de calidad sanitaria no se modificaron en los diferentes grupos según tamaño del rodeo. No hubo efecto del tamaño del rodeo en las variables de calidad sanitaria (RCS y *S. aureus*). Tampoco se registró efecto de la interacción entre estación y tamaño del rodeo sobre las variables de calidad sanitarias estudiadas

Tabla 9. Recuento de células somáticas (RCS) (cél/ml) y *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (log_{10}) (media ± ds) de tanque de frío de 29 establecimientos lecheros según tamaño del rodeo (VO).

	VO1	VO2	VO3	VO4
RCS	367760[a] ±178006	315775[a] ±137043	305341[a] ±113149	464818[a] ±307921
S. aureus	2,22[a] ±0,26	2,09[a] ± 0,21	1,90[a] ± 0,22	2,30[a] ± 0,26

VO1:<50 vacas en ordeñe; VO2: 51-100 vacas en ordeñe; VO3: 101-250 vacas en ordeñe; VO4: >250 vacas en ordeñe. RCS: n=348 (VO1: n=77, VO2: n=109, VO3: n=85; VO4: n=77). *S. aureus*: n=116 (VO1: n=26, VO2: n=37, VO3: n=30, VO4: n=23).

7.3.2 Calidad higiénica: recuento bacteriano, psicrótrofos, termodúricos y aislamientos de *Pseudomonas.*

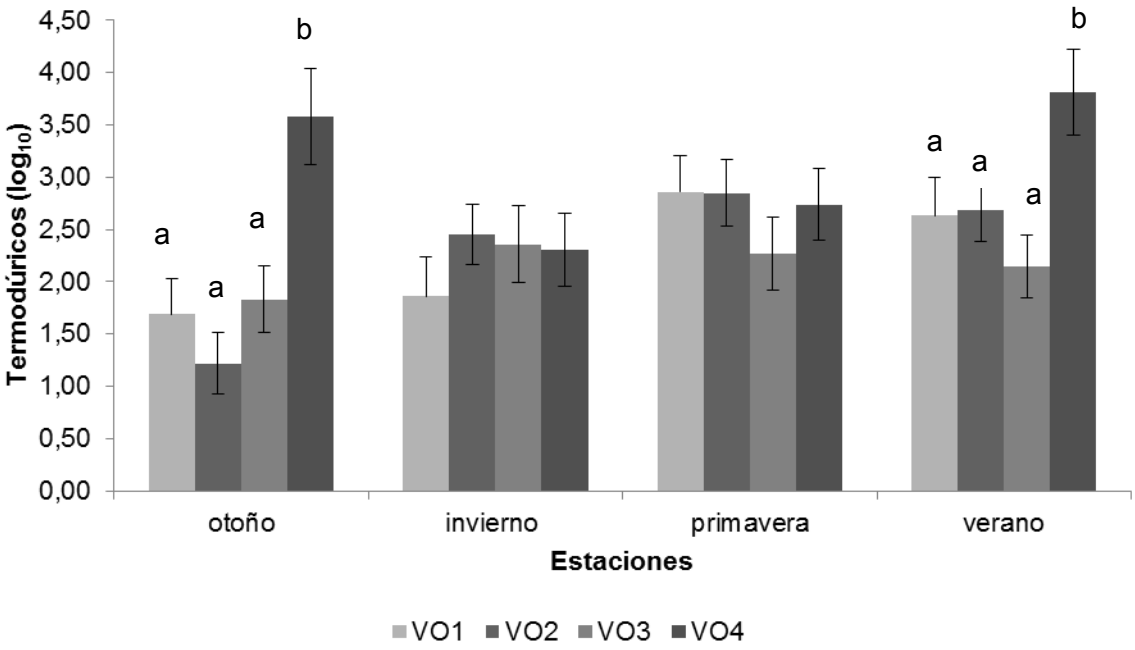
En la Tabla 10 se muestra los recuentos de microorganismos de leche de tanque de acuerdo al tamaño del rodeo. Se observó efecto del tamaño del rodeo para el recuento de termodúricos (p=0,002), mostrando que el grupo VO4 evidenció mayor recuento de termodúricos que el grupo VO1 (p=0,022), VO2 (p=0,002) y VO3 (p=0,001). No se observó efecto del tamaño del rodeo en el resto de los microorganismos. Se registró efecto de la interacción entre estación y tamaño del rodeo sobre el recuento de termodúricos (Gráfica 2). Mientras que para el resto de las variables de calidad higiénicas no se encontró efecto de la interacción entre estación y tamaño del rodeo.

Tabla 10. Recuento bacteriano, psicrótrofos y aislamiento de *Pseudomonas* (log_{10}) (media ± ds) de tanque de frío de 29 establecimientos lechero según tamaño del rodeo (VO).

	VO1	VO2	VO3	VO4
Recuento bacteriano	4,20[a]±0,07	4,23[a]±0,06	4,25[a]±0,06	4,26[a]±0,07
Psicrótrofos	2,77[a]±0,29	1,92[a]±0,24	2,22[a]±0,26	2,58[a]±0,31
Pseudomonas	0,87[a]±0,16	1,06[a]±0,14	1,04[a]±0,15	1,34[a]±0,18
Termodúricos	2,26[a] ±0,18	2,30[a]±0,15	2,15 [a]±0,16	3,10[b]±0,19

VO1:<50 vacas en ordeñe; VO2: 51-100 vacas en ordeñe; VO3: 101-250 vacas en ordeñe; VO4: >250 vacas en ordeñe. Media con letras diferentes indica diferencia significativa (p<0,05). Recuento bacteriano: n=348 (VO1: n=77, VO2: n=109, VO3: n=85; VO4: n=77). Psicrótrofos, termodúricos y Pseudomonas: n=116 (VO1: n=26, VO2: n=37, VO3: n=30, VO4: n=23).

En la Gráfica 2 se presenta el recuento de microorganismos termodúricos según tamaño del rodeo (VO), en las diferentes estaciones. Se observa que hubo efecto del tamaño del rodeo en el recuento de termodúricos en las estaciones (p=0,011). En otoño y verano fueron las estaciones donde se registraron diferencias entre los grupos según tamaño del rodeo. Observándose en ambas estaciones (otoño: p=0,0016 y verano: p=0,018) que el grupo VO4 presentó mayor recuento de termodúricos en comparación con VO1, VO2 y VO3. En el resto de las estaciones no hubo diferencia entre los grupos.



VO1:<50 vacas en ordeñe; VO2: 51-100 vacas en ordeñe; VO3: 101-250 vacas en ordeñe; VO4: >250 vacas en ordeñe. Media con letras diferentes indica diferencia significativa. Termodúricos: n=116 (VO1: n=26, VO2: n=37, VO3: n=30, VO4: n=23).

Gráfica 2. Recuento de termodúricos (log10) según tamaño del rodeo de los establecimientos lecheros estudiados, en las diferentes estaciones.

8. DISCUSIÓN

Este estudio demostró que la estacionalidad afectó la calidad composicional e higiénico-sanitaria de la leche de tanque de frío en rodeos nacionales, siendo verano la estación “crítica” para la producción de leche de calidad. En esta estación disminuyó la calidad higiénico-sanitaria (aumentaron los RCS, aislamientos de *S. aureus, Pseudomonas,* recuento de psicrótrofos y termodúricos) y la calidad de composición (disminución del porcentaje de caseína total y fracciones de caseína). La calidad higiénica disminuyó con el tiempo de almacenamiento en tanque de frío, aumentando el recuento de psicrótrofos. El tamaño del rodeo tuvo efecto sobre la calidad higiénica, aumentando el recuento de termodúricos en muestras provenientes de rodeos con más de 250 vacas.

8.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS ESTABLECIMIENTOS SEGÚN RECUENTO DE CÉLULAS SOMÁTICAS EN EL TANQUE

En todos los meses (excepto agosto), predominaron los establecimientos que superaron las 250000 cél/ml. Además, se observó que en todas las estaciones las muestras analizadas presentaron niveles de RCS por encima de 300000 cél/ml, llegando incluso en algunos casos a estar muy cerca del límite de recibo de leche en plantas 400000 cél/ml (MGAP, 2013). De este resultado se puede inferir que un alto porcentaje de los animales que conforman los rodeos estudiados presentaban mastitis (clínica o subclínica) durante el estudio. Esta afirmación se sustenta según lo reportado por Eberhart et al. (1982) y Brolund et al. (1985), quienes demostraron que recuentos en tanque de 200000 cél/ml indicarían que el 15% de las vacas del rodeo estarían afectadas por mastitis subclínica en uno o más cuartos y por cada incremento adicional de 100000 cél/ml aumenta entre un 8 a 10% las infecciones del rodeo. Recuentos de 400000 cél/ml indicarían que un tercio del rodeo estaría afectado, dependiendo del tipo de microorganismo presente. En este sentido, un elevado RCS en el tanque está asociado con alta prevalencia de mastitis subclínicas causadas por *Str. agalactiae* y *S. aureus* (Olde Riekerink et al. 2006). Por lo tanto, los establecimientos que formaron parte de este estudio se podrían considerar “enfermos” en relación a la salud de ubre. Esto se basa en que presentaron RCS cercanos a 400000 cél/ml y que en la mayoría de los establecimientos (28 de 29) se aislaron *S. aureus* en tanque. Por lo que se sugiere que estos establecimientos tendrían una alta incidencia de mastitis clínica y subclínica (mayor al 45%) a causa principalmente de *S. aureus*. Esto además coincide con los publicado por Plozza et al (2011), quienes reportan que valores de incidencia de mastitis subclínica por encima del 30% en un rodeo, es considerada alta.

El RCS afecta la calidad de los productos lácteos, como el queso o yogur. Quesos (Pratto) elaborados con leche conteniendo menos de 200000 cél/ml presentaron mejores características y menor cantidad de mohos y levaduras, (los que son causa de deterioro) que aquellos elaborados con números más elevados de RCS (Vianna et al. 2008). Rogers y Mitchell (1994), reportaron que las características organolépticas del yogur fueron superiores cuando se elaboraron con leches conteniendo RCS por debajo de 250000 cél/ml, en comparación con leches con RCS por encima de 500000 cél/ml. Es importante resaltar que los establecimientos estudiados son remitentes a industrias donde su principal producto de elaboración es el queso. Por lo tanto, los altos RCS (> a 300000 cél/ml) obtenidos en estas condiciones podrían estar afectando la calidad del queso producido, a pesar que los valores se encuentren por debajo de los límites reglamentarios de calidad existentes en nuestro país. A nivel de producción primaria, además, el alto porcentaje de mastitis subclínica repercute en el resultado económico de los establecimientos considerando el nivel de infección y sus consecuencias en pérdidas de producción, gastos de tratamientos y aumento en el riesgo de aparición de residuos de antimicrobianos (Van Schailk et al. 2002), lo que también podría afectar a la industria y sus productos de elaboración.

En base a la información presentada anteriormente, es importante considerar que los efectos que se estudiaron en este trabajo fueron en base a una población de rodeos enfermos los que pueden no seguir el mismo patrón en rodeos considerados sanos (porcentaje de mastitis subclínica por debajo del 20% y con RCS menores a 250000 cél/ml).

8.2 VARIACIÓN ESTACIONAL DE LA CALIDAD HIGIÉNICO- SANITARIA Y DE COMPOSICIÓN

Debemos tener en cuenta que existen múltiples factores que determinan la calidad higiénico-sanitaria y de composición en la leche, como puede ser la alimentación, la etapa de lactancia, el número de partos, el estrés térmico y la salud de ubre. Muchos de estos factores en leche de tanque actúan en forma conjunta afectando su calidad. En esta tesis se observó que particularmente en verano, los parámetros de calidad higiénico-sanitaria, porcentaje de caseína y fracciones de caseína se afectaron negativamente, repercutiendo en una leche de menor calidad.

A pesar que el recuento bacteriano en todas las estaciones se mantuvo por debajo de 40000 ufc/ml, estando dentro del límite establecido por el decreto de calidad de leche (MGAP, 2013) y de los límites de las industrias para leche de excelente calidad (Conaprole, 2015), en el caso del recuento de psicrótrofos, termodúricos y aislamientos de *Psedumonas* la situación fue diferente. Esto es importante debido a que en algunos países estos microorganismos son utilizados complementariamente como indicadores de calidad. En este sentido, la Unión Europea actualmente tiene como límites

de calidad higiénica $<10^5$ ufc/ml para recuento bacteriano y $<10^3$ ufc/ml de psicrótrofos (Samarzija et al. 2012). En el caso de los termordúricos, recuentos de <200 ufc/ml en leche de tanque son indicativos de buena calidad (Gillespie et al. 2012, Gleeson et al. 2013, Jayarao et al. 2004). En Nueva Zelanda las industrias penalizan cuando el recuento de termodúricos se encuentra por encima de 1500 ufc/ml (Fabro, 2011). El recuento bacteriano (recuento de mesófilos aerobios totales) se afecta principalmente por malas prácticas en el establecimiento, como deficiencia en la higiene durante la rutina, problemas en la limpieza de los equipos y mal funcionamiento del tanque de frío (Elmoslemany et al. 2009). Estas situaciones se hacen más evidentes en el verano, principalmente por aumento de la temperatura ambiental. En el caso de los psicrótrofos, Cousin (1982), reportó que aumentan en verano debido a un mayor recuento bacteriano por problemas de higiene durante las épocas de mayores temperaturas. Cempirková (2002), reportó una alta correlación (r=0,69) entre el número de psicrótrofos y el recuento bacteriano total en leche de tanque. Sin embargo Holm et al. (2004), afirman que en el caso que los establecimentos presenten recuentos menores a 30000 ufc/ml, los psicrótrofos fueron dominantes sólo en el 28% de los casos. Otros autores también obtuvieron aumento de estos microorganismos en verano, explicado por aumento de *B. cereus* como principal microorganismo psicrótrofo (Christiansson et al. 1999, Shuterland y Murdoch et al. 1994). Por otro lado, Vithanage et al. (2016), en Australia reportan aumento de los psicrótrofos en invierno con predominancia de *Pseudomona.* En Uruguay se observó que *Pseudomonas* y *Flavobacterium* presentaron mayor ocurrencia de aislamientos en otoño-invierno, mientras que *Enterobacte*r y *Acinectobacter* fueron mayores en primavera-verano (Bermúdez et al. 2011). En el presente trabajo el recuento de psicrótrofos aumentó en la estación de verano, encontrándose muy por encima del límite reglamentario según bibliografía internacional. Estos resultados coinciden con lo reportado por varios autores, lo que se podría explicar por mayores problemas en el control de la higiene en esta estación. En la época de verano la temperatura ambiental es favorable para el crecimiento bacteriano, haciendo más difícil controlar la contaminación de la leche a partir de las diferentes fuentes de contaminación del establecimiento (higiene de los animales, limpieza de la máquina de ordeñe, temperatura del tanque de frío, ambiente productivo). A su vez, la diferencia estacional de estos microorganismos entre los países puede deberse a que como los psicrótrofos no pertenecen a un género bacteriano en particular su fluctuación dependerá del género que predomine según la temperatura ambiental (Hantsis-Zacharov y Halpern, 2007) y el ambiente productivo. Por otro lado, algunos autores reportan que *Pseudomonas* es el principal microorganismo psicrótrofo encontrado en leche (Guerrero et al. 2003). Al estudiar la variación estacional de microorganismos en queserías artesanales en Francia, Leriche y Fayolle (2012), observaron que

Pseudomonas no mostró un patrón estacional. Otros autores, registraron que con recuentos bacterianos altos, el número de psicrótrofos Gram negativos en leche cruda se encontraba en un 75-99% del total de la población, con predominancia de *Pseudomonas fluorescens* (Cox, 1993). Sin embargo, Meer et al. (1991), afirman que el género *Pseudomonas* en general no superan el 10% de la población de psicrótrofos. En este trabajo, en acuerdo con los autores anteriormente mencionados, se demostró que con recuentos bacterianos <40000 ufc/ml, el recuento de *Pseudomonas* fue muy bajo en relación al total de psicrótrofos (por debajo del 4% en todas las estaciones). En verano tuvieron una tendencia a aumentar al igual que los psicrótrofos, aunque la proporción en relación se mantuvo baja (2%). Por lo que es posible pensar que el aumento de psicrótrofos en este trabajo en la estación de verano se debió a causa de otro género bacteriano diferente a *Pseudomonas*. En este sentido, Gillespie et al. (2012), al estudiar la población de microorganismos psicrótrofos en leche de tanque durante diferentes estaciones, identificaron baja proporción de *Pseudomonas* y bacilos Gram positivos.

En el caso de termodúricos, se observa que los valores fueron altos en todas las estaciones, registrándose el valor más alto en el verano. Esto puede ser a causa de problemas en la limpieza de equipos y manejo de la rutina en el ordeñe. Una de las fuentes de contaminación en leche de tanque es el equipo de ordeñe, por formación de depósitos de suciedad debido a la mala higiene (Gleeson et al. 2013). Además, estos microorganismos tienen la capacidad de generar biofilm en las superficies de los equipos siendo muy difíciles de eliminar con la limpieza rutinaria de los establecimientos y plantas lecheras (Reginensi et al. 2011). Lo que conduce a que exista alto riesgo de contaminación de la leche en el propio establecimiento lechero. Este problema aumenta en las estaciones de verano y primavera dado que a mayor temperatura ambiente se facilita el crecimiento microbiano.

Por lo tanto, la calidad higiénica de la leche de tanque en la estación de verano se afectó negativamente, constatada por el aumento de psicrótrofos, *Pseudomonas* y termodúricos en comparación al resto de las estaciones, a pesar que el recuento bacteriano se mantuvo dentro de los límites reglamentarios de calidad (decreto e industria). En el caso del recuento de psicrótrofos se sugiere que este aumento no fue a causa del género *Pseudomonas*, siendo importante en futuros trabajos, estudiar los géneros bacterianos que componen los grupos de microorganismos psicrótrofos y termodúricos (esporulados y no esporulados) en leche de tanque. Este conocimiento permitirá conocer el origen de estos microorganismos y por lo tanto su control en el establecimiento lechero, mejorando la calidad de la leche particularmente en esta estación. Este estudio demuestra la importancia de incorporar el recuento de psicrótrofos y termodúricos para la evaluación de la calidad higiénica de leche de tanque, además del recuento bacteriano el que se utiliza actualmente por la reglamentación nacional.

La calidad sanitaria (RCS y *S. aureus)*, el porcentaje de caseína y fracciones de caseína en leche de tanque pueden variar a causa de muchos factores tales como ciclo de lactancia, estado de salud de la ubre, acceso a la pastura, manejo y factores medioambientales (temperatura, humedad y estación) (Morse et al. 1988; Barbano et al. 1991; Hogan y Smith, 1997; Faye et al. 1998) entre otros. En el presente estudio el 70% de los establecimientos mostraron pariciones continuas con concentración de partos en otoño (marzo, abril). Por lo que en los meses de enero y febrero hay un alto porcentaje de vacas secas y en el último tercio de la lactancia en los rodeos lecheros. Este manejo realizado con frecuencia en la región litoral norte, se orienta a disminuir el número de vacas en ordeñe en verano, dado las altas temperaturas que se registran en esta estación. La baja producción de leche por vaca, registrada en este trabajo en verano, está relacionada con la situación señalada anteriormente. Estos resultados coinciden con lo reportado por De Vries et al. (2005), sobre los menores niveles de producción de leche y el aumento de RCS en la región de Florida (EEUU) en los meses de verano dado por la estacionalidad en la época de partos. En relación a la calidad sanitaria, los RCS registrados, coinciden con otros autores quienes encontraron aumento de RCS en verano (Olde Riekerink et al. 2007, Archer et al. 2013). Ferreira et al. (2015), estudiaron el RCS en diferentes regiones de Florida (EEUU) obteniendo un claro patrón estacional con aumento del RCS en el verano y una disminución en invierno, resultado que lo atribuyen a la concentración de partos en invierno y al estrés calórico que sufren los animales en esa región (considerada subtropical con temperaturas por encima de 25°C). En verano también se registró un aumento de aislamientos de *S. aureus*. Este microorganismo puede tener muchos orígenes en leche de tanque como ubre, piel de pezón, piel del animal, máquina de ordeñe, manos del ordeñador, narinas, entre otros (Haveri, et al. 2008, Capurro, et al. 2010). Aunque la causa más importante del hallazgo de este microorganismo en leche de tanque es a partir de infecciones intramamarias de vacas infectadas (Harmon, 1994; Capurro et al. 2010). El aumento en los aislamientos de *S. aureus* en verano podría explicarse porque, como este microorganismo produce infecciones crónicas (Zadoks et al. 2001; Barkema et al. 2006), los aislamientos podrían aumentar al final de la lactancia. Esto puede deberse a que las vacas al permanecer más tiempo expuestas a las fuentes de contagio tienen mayor riesgo de adquirir infecciones intramamarias por microorganismos contagiosos y manifestarse en la época de mayor temperatura (verano). Coincidiendo con Cziszter et al. (2012), quienes observaron que en verano existe mayor suceptibilidad de adquirir nuevas infecciones intramamarias, aumentando la posibilidad de encontrar altos recuentos de estos microorganismos en leche de tanque. Es importante resaltar que si bien en todas las estaciones se aisló este microorganismo, particularmente en el verano, superó el límite

máximo aceptable en leche de tanque de 1000ufc/ml (Mhone et al. 2011, MSP, 1994), lo que podría además explicar el alto RCS en esta estación. Como se comentó anteriormente, *S. aureus* causa una infección crónica con períodos de manifestaciones clínicas y liberación intermitente (Harmon, 1994). Se ha estudiado que hasta 100 días antes de la presentación de los síntomas de mastitis clínica causada por este microorganismo se detectaron recuentos celulares altos (356000 cél/ml), sugiriendo que este patógeno se encuentra presente subclinicamente antes de la manifestación clínica de la enfermedad. Esto puede explicar que luego de una infección por *S. aureus* se mantengan niveles de células somáticas altas (460000 cél/ml), demorando más de 20 días en normalizarse (De Hass et al. 2002). Por lo tanto, una de las causas de que el RCS se haya mantenido alto (por encima de 300000 cél/ml) durante los meses que se realizó el estudio, puede ser la presencia de infecciones crónica causadas por *S. aureus* durante toda la lactancia en los rodeos estudiados.

La lactancia también estaría influyendo en la variación estacional de los sólidos**,** (Silvestre et al. 2009). La caseína y el contenido de fracciones de caseína exhiben las características normales de la dinámica de la lactación de los sólidos de la leche. Los componentes de la leche presentan altos contenidos en la temprana lactación, disminución al mínimo en la mitad de la lactancia seguido por un crecimiento gradual hacia la última parte de la lactación (Ng-Kwai-Hang et al. 1984). En el caso de las fracciones de caseína, Kroecher et al. (1985), obtuvieron altos valores de β caseína en los primeros 60 días de lactación. Mientras que Davies y Law, (1977), encontraron valores altos de esta fracción entre los 60 y 160 días de lactación. En relación a la κ caseína Kroecher et al. (1985), no observaron cambios significativos a través de la lactancia en leche bovina. En este trabajo, los altos valores de porcentaje de caseína total y de todas las fracciones de caseína registrados en la época de otoño-invierno podrían coincidir con un alto porcentaje de vacas en los primeros días de lactación, (incluyendo el pico de lactación) seguido de una clara disminución de los sólidos hacia la primavera. Mientras que en verano (lactancia tardía) continuaron disminuyendo, no siguiendo en esta estación el patrón normal de la lactancia. Por lo tanto, se sugiere que la variación estacional de la caseína y fracciones de caseína se puede explicar en parte, por el momento de la lactancia, principalmente en otoño, invierno y primavera. No obstante, en verano existen otros factores como el estrés calórico (Bernabucci y Calamari, 1998, Bernabucci et al. 2015), salud de ubre, calidad higiénica (Forsbäck et al. 2010, Morse et al. 1988, Harmon, 1994) y alimentación que en forma conjunta, podrían estar afectando negativamente estas variables

El estrés calórico es uno de los factores que pudo influir en la disminución de la calidad de la leche en la época de verano. Contribuyendo al aumento de RCS y *S. aureus* y disminución de los porcentajes de caseína y fracciones de caseína en esta estación. Esto concuerda con los valores de ITH de

72±0,5 registrados en este estudio en los meses de enero y febrero. Los altos RCS en verano se pueden deber a que el estrés calórico contribuye al aumento del riesgo de infecciones intramamarias (Morse et al. 1988). A causa de la disminución de la resistencia del huésped a las infecciones (Merlot, 2004) y al incremento de la exposición a patógenos, los que se ven favorecidos en su crecimiento, por el ambiente cálido y húmedo. Los altos RCS en verano obtenidos en este estudio coinciden con lo reportado por Green et al. (2006), Olde Riekerink et al. (2007), Lievaart et al. (2007) en Inglaterra, Canadá y Holanda, respectivamente. Por otro lado, en este estudio también se registró una disminución de la producción de leche individual en verano, lo que podría ser consecuencia del estrés térmico que sufren los animales en esta estación. Es importante el dato que durante la estación de verano, en la región litoral norte del país cuando se realizó este trabajo (noviembre 2012 a febrero 2013) las temperaturas oscilaron entre 18 y 35 C° de forma constante en todos los meses. Ferreira et al. (2015), observaron también una disminución de leche durante los meses de verano con temperaturas mayores a 25°C. En un trabajo realizado en esta región (Salto-Uruguay), Saravia et al. (2012) registraron aumento del RCS y disminución de los sólidos y producción de leche al registrarse valores de ITH por encima de 72 por 3 días consecutivos y temperaturas entre 23 a 29°C (olas de calor severas). Lo que sugiere una relación positiva entre el estrés provocado por altas temperaturas y un alto RCS. Esto, reafirma la idea de que la época de verano, es una época “crítica” para la salud de ubre. Por otro lado, varios autores han demostrado el efecto negativo del estrés calórico sobre la producción y composición de la leche (Cowley et al. 2015; Bernabucci et al. 2015), demostrando que la caseína y proteína de la leche disminuyen en la época de verano. Muchos autores estudiaron los diferentes valores del ITH que afectan la proteína y caseína de la leche. Bernabucci et al. (2010) observaron que con valores de ITH por encima de 68 se afecta la producción y los sólidos de la leche. Registrándose que la producción de leche en vacas Holando disminuye 0,27kg por unidad de ITH. Bertocchi et al. (2014), reportaron el efecto negativo sobre la proteína con valores de ITH por encima de 65,2 mientras que Ominski et al. (2002), observaron que ITH por encima de 72 el efecto residual sobre las proteínas se mantuvo por 5 días después del estrés calórico. En Uruguay también se han demostrado los efectos negativos en la producción y sólidos de la leche principalmente en verano con valores de ITH por encima de 68 (Roman et al. 2014). Si bien hay muy pocos trabajos que estudiaron el efecto del estrés calórico sobre la caseína y fracciones de caseína en leche (Cowley et al. 2015), se ha estudiado que las altas temperaturas afectan las características de la leche que determinan la obtención de quesos de buena calidad (Bernabucci et al. 2015). Los altos niveles de ITH afectarían los sólidos de la leche, porque bajo condiciones de estrés calórico la vaca experimenta cambios en las respuestas fisiológicas, como disminución del consumo voluntario, aumento

del metabolismo, disminución en la producción de leche y disminución de la calidad de la leche (Kadzere et al. 2002). En otro sentido, algunos autores demostraron que el estrés calórico (por causas diferentes a la disminución del consumo), tuvo mayor influencia sobre la concentración de proteína y fracciones de caseína que la restricción en la alimentación (Rohads et al. 2009; Cowley et al. 2015). Esto podría ayudar a explicar los resultados obtenidos en el presente trabajo sobre la disminución de los porcentajes de caseína y sus fracciones en el verano. Dado que si bien en verano no hubo grandes diferencias en la suplementación con respecto a la primavera, se registraron altos niveles de ITH. Lo que sugiere un claro efecto del estrés calórico en estas variables en la estación de verano. En este sentido, Han et al. (2011), determinaron que el estrés térmico, induce una respuesta al estrés de las células del epitelio mamario disminuyendo la secreción y síntesis de las proteínas de la leche, pudiéndose sugerir como una de las explicaciones de la disminución de la caseína y fracciones de caseína en el verano, no relacionado a la disminución del consumo de energía.

Los cambios en la alimentación en las diferentes estaciones puede ser otra de las causas de la variación en la producción y porcentaje de sólidos a lo largo del año de estudio. Las variaciones en la producción y calidad del forraje vinculado al clima que se da en los sistemas con base pastoril, tienen una gran influencia en la composición de la leche. Esto concuerda con lo publicado por Cavache y Navas (2012), quienes afirman que los cambios en las condiciones climáticas que se dan a lo largo del año, afectan la alimentación de la vaca lechera, lo que se da principalmente por las diferencias en los aportes nutricionales de las praderas a lo largo del año. En este trabajo, si bien los sistemas de producción estudiados, basan su dieta en la pastura (praderas implantadas y verdeos de verano), en la época de otoño e invierno la suplementación en base a concentrados y ensilaje tuvo un rol importante. En primavera, la cantidad de energía aportada por el suplemento fue menor en comparación con otoño tornándose una dieta más pastoril, siendo la pastura el alimento predominante. Durante el pastoreo se favorece el consumo de materia seca en base a una cosecha directa del forraje, con un esquema de fermentación ruminal más eficiente descripto por Mayne y Thomas (1994), aumentando la disponibilidad de aminoácidos en la glándula mamaria para la síntesis de caseína. En la época de verano el suministro de concentrados fue similar a la primavera, pero con menor calidad de la pastura (Colzada, 2015) y menor suplementación en comparación con otoño. Según Kolver (2003), el componente energético es considerado el nutriente que más limita la producción de leche, tanto en sistemas estabulados como pastoriles. Es conocido que el porcentaje de proteínas en la leche está asociado positivamente al consumo de energía (DePeters y Ferguson 1992; Mackle et al. 1999), por lo que una restricción en el aporte de energía produce efectos marcados tanto sobre la producción como la composición de leche. Por lo tanto en las épocas donde hay mayor

disponibilidad de concentrados, aumentarían los porcentajes de proteína, caseína y fracciones de caseína en leche. Esto se debe a que, al aumentar la inclusión de concentrados en la dieta aumenta la producción de AGV en el rumen, a favor de la producción de ácido propiónico, aumentando la gluconeogénesis y por lo tanto, aumenta la energía disponible para la síntesis de los componentes de la leche, como proteínas y lactosa (Sutton y Morant 1989). En este estudio, en las épocas de otoño-invierno se registraron los mayores valores de caseínatotal y fracciones de caseína en leche, coincidiendo en que estas estaciones fueron en comparación con primavera y verano, donde hubo mayor oferta de concentrado por vaca en ordeño. Esto se puede explicar según lo reportado por Mackle et al. (1999), que al agregar concentrado en dietas a base de pastoreo, en comparación con pastoreo restringido aumenta la producción de leche así como la concentración de caseína total, α, β y κ- caseína en las estaciones de primavera y verano (lactancia temprana y tardía respectivamente). Esto reafirma lo reportado por Kefford et al. (1995), sobre la importancia de mantener un consumo energético constante en la vaca lechera para optimizar la producción de leche. En este trabajo se registró una disminución de todos los componentes estudiados de la primavera hacia el verano. Lo que se puede atribuir no sóolo a la alimentación, sino a todos los factores anteriormente mencionados que actuando juntos hacen a que la estación de verano sea una estación “critica” para la producción de leche.

8.2.1 Asociación entre la calidad higiénico-sanitaria y la composición

Debemos destacar el alto recuento de microorganismos psicrótrofos en el verano junto con una clara disminución de los componentes de la leche estudiados. Es conocido que los psicrótrofos son microorganismos indeseables para la industria láctea porque generan enzimas lipolíticas y proteolíticas termoresistentes alterando la composición de la leche y por ende los productos lácteos (Cromie, 1992). Saeman et al. (1988), demostraron que enzimas proteolíticas producidas por algunos microorganismos causan degradación de las proteínas, principalmente caseínas. La degradación de las caseínas afecta negativamente el rendimiento quesero, la vida útil de los productos y producción de sabores no deseados. En un estudio realizado en Uruguay se encontró que las cepas de *Pseudomonas y Flavobacterium* presentaron los mayores niveles de actividad proteolítica y lipolítica, lo cual incide en la presencia de enzimas de deterioro termoestables que continuarán su acción luego de finalizada la manufactura láctea (Reginensi et al. 2011). Por todo esto, el aumento en el recuento de psicrótrofos (aumento de la actividad proteolítica) en verano, puede ser una de las causas de la disminución de caseína y fracciones en leche de tanque en esta estación. Por otro lado, el aumento del RCS durante la estación de verano, también puede explicar esta disminución. Esto se puede deber a causa del daño en el epitelio mamario generado durante la

inflamación, que repercute en la síntesis de los componentes de la leche (Harmon, 1994) sumado al aumento de la actividad enzimática que se da durante el proceso de la enfermedad (enzimas endógenas) (Guerrero et al. 2003, Deeth 2006; Leitner et al. 2006). Coincidiendo con Barbano et al. (1991) y Forsbäck et al. (2010), quienes afirman que las proteínas, especialmente las caseínas son susceptibles a la degradación por enzimas endógenas y exógenas y que a partir de 100000 cél/ml se altera la composición de la proteína. Es interesante destacar que algunos autores han encontrado que las enzimas endógenas tienen un efecto negativo sobre la α y β caseína pero no sobre la k caseína (Fajardo-Lira et al. 2000 y Bernabucci et al. 2015). En este trabajo se observó que en verano disminuyeron todas las fracciones, inclusive la k caseína, al igual que el porcentaje total de caseína. Como se planteó previamente, esta disminución no se puede adjudicar sólo a efecto del aumento de la actividad enzimática, sino a varios factores que actuando en conjunto afectan la calidad de la leche de tanque en el verano. Pero en base a los resultados obtenidos y a la literatura existente, se puede sugerir que el aumento de psicrótrofos y RCS contribuyeron a la disminución de los porcentajes de caseína y fracciones de caseína en el verano, con la consecuente pérdida de calidad de la leche de tanque en esta estación.

8.3 EFECTO DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO DE LA LECHE Y TAMAÑO DEL RODEO SOBRE LA CALIDAD HIGIÉNICO- SANITARIA

Al estudiar el tiempo de almacenamiento en frío, se observó que el recuento de psicrótrofos aumentó con el tiempo. Sin embargo, el recuento de mesófilos y termodúricos no se afectaron por el tiempo de almacenamiento. Es conocido que los psicrótrofos generan importantes problemas en la industria láctea, por la particularidad que tienen de crecer a temperaturas menores a 7°C y temperaturas óptimas de crecimiento 15 -20°C (De Oliveira et al. 2015). En los establecimientos lecheros el almacenamiento en frío de la leche cruda es la herramienta utilizada para controlar en forma eficaz el desarrollo de las poblaciones de microorganismos mesófilos, mientras que al mismo tiempo proporciona una ventaja selectiva para el crecimiento de bacterias psicrótrofas (Barbano et al. 2006). Esto explicaría el resultado obtenido en este estudio, dado que el recuento bacteriano no aumentó a mayor tiempo de almacenamiento en tanque, mientras que el recuento de psicrótrofos tuvo un aumento significativo a las 48hs de almacenamiento. Es interesante destacar que algunos autores observaron que la leche fresca recién ordeñada no contiene poblaciones detectables de microorganismos psicrótrofos (De Oliveira et al. 2015). Sin embargo, estos microorganismos se desarrollan a medida que aumenta el tiempo de almacenamiento en condiciones de refrigeración (Raats et al. 2011). En este sentido, Vithanage et al. (2016), reportan que a mayor tiempo de

almacenamiento a temperaturas de 2 a 12°C aumentan los microorganismos psicrótrofos (8-10°C) y De Oliveira et al (2015), observaron en leche almacenada por 48hs en frío un aumento del recuento de psicrótrofos hasta 2log (10^5 a 10^7).

En el caso de los microorganismos termodúricos no se encontró diferencia significativa entre los grupos, aunque se observa una tendencia a aumentar con el tiempo de almacenamiento en frío. Esto se podría explicar en parte, porque en leche y productos lácteos existen microorganismos que comparten las características de termodúrico y psicrótrofo como *Bacillus* cereus (predominante en leche) (Garcia-Armesto y Sutherland, 1997). Pero también existen otros microorganismos que resisten temperaturas de pasteurización pero no tienen la capacidad de crecer en frío como *B. Licheniformes y B. subtilis* (Buehner et al. 2014). Por lo tanto, probablemente en este estudio, dentro del grupo de los termodúricos existan microorganismos que resisten temperaturas de pasteurización pero que no tienen la capacidad de crecer a temperatura de refrigeración (psicrótrofos), por lo tanto no aumentan durante el almacenamiento en frío.

Por otro lado, la calidad sanitaria evaluada a través del RCS *y S. aureus* no tuvo efecto del tiempo de almacenamiento en tanque de frío. Lo que era de esperar dado que el RCS y *S. aureus* son variables que están directamente relacionadas al animal, como se explicó anteriormente, no teniendo influencia ni el tiempo ni la temperatura de almacenamiento. En este sentido, investigadores reportaron que el almacenaje de la leche a temperatura de refrigeración (5 ± 1ºC) por 3 y 5 días no afectó el recuento celular ni las variables de calidad, excepto el recuento de psicrótrofos (Zeng et al. 2007). Lo que coincide con los resultados obtenidos en este trabajo.

Con respecto al efecto del tamaño del rodeo sobre la calidad sanitaria, no se observaron diferencias entre los grupos en ninguna de las variables estudiadas. Aunque el grupo de muestras con mayor número de vacas en ordeño presentó el valor más alto de RCS. Esto es de gran importancia dado que este valor superó el límite reglamentario para recibo de las plantas (MGAP, 2013). Es conocido que la salud de ubre evaluada en base al RCS y aislamientos de *S. aureus*, depende de varios factores entre ellos, las prácticas de manejo, variables asociadas al nivel de producción, variables que afectan las infecciones intramamarias, pre y post dipping, uso de terapias de secado (Oleggini et al. 2001). En este trabajo a pesar que los establecimientos que formaron parte de este estudio presentaron manejos muy diferentes relacionados a la salud de ubre y rutina de ordeño, al haberse analizado todas las muestras en conjunto, no se registraron diferencias significativas según tamaño del rodeo. Algunos autores, relacionan mayores tamaños del rodeo con incrementos en el RCS, requiriendo más atención en la salud de ubre cuando aumenta el tamaño del rodeo (Archer et al. 2013). Esto se puede deber porque al aumentar el

tamaño del rodeo se podría incrementar el riesgo de transmisión de patógenos durante el ordeñe a partir de malas prácticas de manejo. En países donde la producción lechera se hace de forma estabulada, al aumentar el tamaño del rodeo aumentaría el riesgo de infecciones intramamarias por patógenos ambientales como *Streptococcus uberis* (Lopez- Benavides et al. 2009). En este estudio si bien la mayoría de los establecimientos presentaban un sistema de producción semi extensivo, los rodeos de mayor tamaño realizan un manejo con "encierros" en determinadas estaciones del año, lo que podría favorecer las infecciones intramamarias a causa de microorganismos ambientales (aumentando el RCS). Esto a su vez concuerda con los resultados obtenidos para *S. aureus* quien no mostró aumento a mayor tamaño del rodeo.

En el mismo sentido, se registró aumento del recuento de termodúricos en el grupo de mayor número de vacas en ordeñe. Está descripto que estos microorganismos en leche de tanque tienen su origen a partir del ambiente del tambo, encontrando altos niveles en ensilaje, materiales de cama y materia fecal (Vissers et al. 2007). Julien et al. (2008), demostraron que el ensilaje de maíz es una fuente importante de esporas en leche de tanque. Siendo los microorganismos termodúricos más prevalentes en leche de tanque *Bacillus* que tienen la capacidad de generar esporas, se podría pensar que los establecimientos más grandes al utilizar el "encierro" como parte del manejo alimentario del rodeo, podría ser causa del aumento de estos microorganismos en leche de tanque. En este sentido, se observa que el grupo con mayor número de vacas en ordeñe tuvo mayor recuento de microorganismos termodúricos en otoño y verano en comparación al resto de los grupos. Se puede sugerir que la alimentación en base a concentrados, fue una importante una fuente de contaminación de este tipo de microorganismos en leche, principalmente en otoño. Esto puede deberse al manejo en los rodeos con mayor número de vacas y que en otoño fue donde se registraron los mayores suministros de concentrado, sobre todo ensilaje (kg/vaca/día). En verano, además del manejo en la alimentación, el aumento en el recuento de termodúricos en el grupo con mayor número de vacas podría ser causa de las altas temperaturas que se dan en esta estación, generando como se dijo anteriormente un ambiente beneficioso para el crecimiento de los microorganismos.

9. CONCLUSIONES

La estación afectó la calidad higiénico-sanitaria, caseína total y fracciones de caseína de la leche de tanque de los predios estudiados durante el período de estudio. La calidad de la leche se afectó negativamente en la estación de verano, considerándose una estación “crítica” en la producción de leche de calidad. A pesar que el recuento bacteriano total se mantuvo por debajo de los límites reglamentarios.

El RCS de leche de tanque mostró niveles altos durante todo el año, en base a criterios de calidad sanitaria, no obstante los valores se encontraron por debajo del límite de recibo según reglamentación nacional actual.

El aumento del tamaño del rodeo y el mayor tiempo de almacenamiento en tanque de frío afectaron negativamente la calidad higiénica de la leche en los establecimientos estudiados.

10. IMPLICANCIAS

Según los resultados obtenidos podemos afirmar que la leche obtenida principalmente en la estación de verano, no presenta condiciones de calidad óptima para su industrialización. A pesar que los parámetros de calidad higiénico-santiara (recuento de células somáticas y recuento bacteriano total) se encuentran por debajo de límites establecidos, según reglamentación nacional. Consideramos que los parámetros que se establecieron en este trabajo para la evaluación de la calidad higiénico - sanitaria son más adecuados al tipo de producto que elaboran estas industrias. Evaluar la leche recibida mediante los mismos, permitirá obtener un producto de excelente calidad que le permite a la industria un mejor posicionamiento frente a los mercados internacionales con mayores oportunidades en la comercialización de sus productos. En el caso de la calidad higiénica, si bien el recuento bacteriano total se registró en todas las estaciones por debajo de los límites de calidad según reglamentación nacional y por debajo del límite de excelente calidad fijado por las industrias para su bonificación. Al estudiar el recuento de psicrótrofos y termodúricos registramos que en la estación de verano, superaron los límites reglamentarios a nivel internacional (Unión Europea), para leche utilizada como materia prima para su industrialización. Esto demuestra que si bien el recuento bacteriano total es un reflejo de la higiene con la que fue obtenida esa leche, no es suficiente para valorar la calidad de la leche destinada a la industrialización. Es importante la incorporación de otros parámetros para su evaluación a nivel de leche de tanque. Esta información le sirve a la industria para ser más exigentes en el control de calidad de su leche y de esa forma evitar problemas en los productos industrializados, principalmente queso y suero en polvo, productos principales de exportación de estas industrias.

Está ampliamente demostrado que altos RCS traen consecuencias en la industrialización de la leche y en los productos elaborados como queso y yogur entre otros. Por lo que conocer ese recuento y su variación estacional es muy relevante para las industrias de la región. Al comparar los valores obtenidos en las diferentes estaciones (principalmente en la estación de verano) se observa que los RCS se encuentran por encima de los reglamentos de bonificación de calidad por parte de las industrias y la reglamentación internacional. A su vez según la bibliografía citada, los RCS obtenidos en este estudio demuestran que esos rodeos presentan altos porcentajes de vacas con problemas de salud de ubre. Esta situación lleva a mayores riesgos de presencia de antibióticos en tanque, problemas en la industrialización de la leche, además del gran perjuicio económico que le genera al productor. En este sentido también se encontró presencia de *S. aureus* en leche de tanque en 28 de 29 establecimientos estudiados. La

presencia de este microorganismo además de ser un potencial riesgo para la salud humana, nos da una idea de su prevalencia en los rodeos lecheros en la región, como patógeno de mastitis. Esto implica un grave problema para la producción de leche, ya que es un micoorganismo que causa infecciones crónicas. Esta información es de relevancia a la industria y a los productores, ya que se podrán implementar sistemas de control en forma conjunta y de esta manera mejorar la calidad de la leche producida en la región.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Acosta Y. (2008). Por una Lechería eficiente. Utilización de ensilajes de grano húmedo: Mezclas de granos de Maíz y Sorgo. Jornada de Lechería. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA), La Estanzuela, Serie Actividades de Difusión Nro. 548. Florida – Uruguay.
2. Acosta Y. (2002). Calidad de la leche, alimentación y rendimiento de sólidos. Jornada de difusión. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA), La Estanzuela, Serie de Actividades de Difusión Nro. 287. Colonia-Uruguay.
3. Albenzio M, Caroprese M, Santillo A, Marino R, Taibi L, Sevi A. (2004). Effects of somatic cell count and stage of lactation on the plasmin activity and cheese-making properties of ewe milk. J Dairy Sci 87:533–542.
4. Allore H, Oltenacu P, Erb H. (1997). Effects of season, herd size, and geographic region on the composition and quality of milk in the Northeast. J Dairy Sci 80:3040-3049.
5. American Public Health Association. (2001) Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods. Ed. American Public Health Association. 4a ed. Washington DC.
6. Archer S, Mc Coy F, Wapenaar W, Green M. (2013). Association of season and herd size with somatic cell count for cows in Irish, English, and Welsh dairy herds. Vet J 196:515-521.
7. Artegoitia V, Meikle A, Olazabal L, Damián JP, Adrien ML, Mattiauda DA, Bermudez J, Torre A, Carriquiry M. (2013). Milk casein and fatty acid fractions in early lactation are affected by nutritional regulation of body condition score at the beginning of the transition period in primiparous and multiparous cows under grazing conditions. J Anim Physiol Anim Nutr 97 (5):919-932
8. Astigarraga L. (2003). El manejo de la alimentación como herramienta para modificar la composición química de la leche. En: Cabrera M.C., Astigarraga L, Saadoun A. Calidad de alimentos y calidad de productos de origen animal. Montevideo. Universidad de la República, pp. 135-150.
9. Auldist M, Coats B, Sutherland J, Mayes H, McDowell L, Rogers. (1996). Effects of somatic cell count and stage of lactation on raw milk composition and the yield and quality of Cheddar cheese. J Dairy Res 63 (2):269–280.
10. Barbano D, Ma Y, Santos V. (2006). Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life. J Dairy Sci 89 (E: Suppl.): 15-19.

11. Barbano D, Rasmussen R, y Lynch J. (1991). Influence of milk somatic cell count and milk age on cheese yield. J Dairy Sci 74:369–388.
12. Barbosa C, Regina Barreiro J, Mestieri L, De Felicio M, Veiga M. (2013) Effect of somatic cell count and mastitis pathogens on milk composition in Gyr cows. Vet Res 9:67-73.
13. Bartlett P, Miller G, Anderson C, Kirk, J. (1990). Milk production and somatic cel count in Michigan dairy herds. J Dairy Sci 73: 2794 - 2800.
14. Barkema H, Schukken Y, Lam T, Beiboer M, Wilmink H, Benedictus G, Brand A. (1998). Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. J Dairy Sci 81:411-419.
15. Barkema H, Schukken Y, Zadoks R. (2006).The role of cow, pathogen, and treatment regime in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. J Dairy Sci 89: 1877-1895.
16. Bargo F, Muller L, Kolver E, Delahoy. (2003). Invited Review: Production and digestion of supplemented dairy cows on pasture. J Dairy Sci 86: 1–42.
17. Bermúdez J, Moreno E, González M, Reginensi S. (2011). Importancia de los micoorganismos psicrótrofos y esporulados aérobicos en el deterioro de productos lácteos. En: Leche inestable desafíos en el cono sur. II Conferencia Internacional. Ed. Tradinco SA. 1ª ed. pp: 36 – 42.
18. Bauman D.E., Mather I.H., Wall R.J., Lock A.L. (2006) Major Advances Associated with the Biosynthesis of Milk. J. Dairy Sci. 89:1235–1243.
19. Bernabucci U, Basiricó L, Morera P, Dipasquale D, Vitali A, Piccioli Cappelli F, Calamari L. (2015). Effect of summer season on milk protein fractions in Holstein cows. J Dairy Sci 98:1815–1827.
20. Bernabucci U, Calamari L. (1998). Effects of heat stress on bovine milk yield and composition. Zootecnica e Nutrizione Animale 24: 247-257.
21. Bertocchi L, Vitali A, Lacetera N, Nardone A, Varisco G, Bernabucci U. (2014). Seasonal variations in the composition of Holstein cow's milk and temperature-humidity index relationship. Animal: 8 (4): 667-674.
22. Bonizzi I, Buffoni J, Feligini M. (2009). Quantification of bovine casein fractions by direct chromatographic analysis of milk. Approaching the application to a real production context. Journal of Chromatography A 1216: 165-168.
23. Boulanger D, Bureau F, Mélotte D, Mainil J, Lekeux P. (2003). Increased Nuclear Factor £eB Activity in Milk Cells of Mastitis-Affected Cows. J Dairy Sci 86:1259-1267.

24. Brolund L. (1985). Cell counts in bovine milk: causes of variation and applicability for diagnosis of subclinical mastitis. Acta Vet. Scand. 80 (Suppl.): 1-123.
25. Buehner K, Anand S, Garcia A. (2014). Prevalence of thermoduric bacteria and spores on 10 Midwest dairy farms J Dairy Sci 97:6777-6784.
26. Calvinho L, Canavesio V y Aguirre N. (2001). Análisis de leche de tanque de frío. Chacra 71 (843): 70-71.
27. Capurro A, Aspán A, Artursson K, Persson Waller K. (2010). Genotypic variation among *Staphylococcus aureus* isolates from cases of clinical mastitis in Swedish dairy cows. Vet J 185: 188-192.
28. Cavache I, Navas A. (2012). Factors that Influence Milk's Nutritional Composition Rev Cienc Anim 5: 73-85.
29. Cempirková R. (2002). Psychrotrophic vs. total bacterial counts in bulk milk samples. Vet Med 47 (8):227-233.
30. Cerón M, Tonhati H, Duarte J, Oliveira J, Muñoz M, Jurado H. (2002). Factors Affecting Somatic Cell Counts and Their Relations with Milk and Milk Constituent Yield in Buffaloes. J Dairy Sci 85:2885-2889.
31. Chen B, Lewis M, Grandison A. (2014). Effect of seasonal variation on the composition and properties of raw milk destined for processing in the UK. Food Chemistry 158: 216–223
32. Christiansson A, Bertilsson J, and Svensson B. (1999). Bacillus cereus in raw milk: Factors affecting the contamination of milk during the grazing period. J Dairy Sci 82:305–314.
33. Colzada E. (2015). Efecto de la estación del año, la alimentación y el ambiente productivo sobre el contenido de caseína en leche: monitoreo de sistemas de producción. Tesis maestría, Facultad de Agronomía, EEMAC, Udelar, Uruguay.
34. Cooperativa Nacional de Productores de Lche (Conaprole). (2015). Pago por calidad de la leche. Disponible en: http://www.conaprole.com.uy Fecha de consulta: 10 de marzo de 2016
35. Cooperativa Laboratorio Veterinario de Colonia (Colaveco) Estadísticas de Calidad de leche de tanque. Disponible en: http://www.colaveco.com/colaveco/index.php Fecha de consulta: marzo de 2016
36. Costerton J, Stewart P, Greenberg E. (1999) Bacterial biofilms: A common cause of persistant infections. Science 284:1318-1322.
37. Coulon J, Verdier I. (1995). Effect of forage type on milk yield, chemical composition and clotting properties of milk. Lait *75:* 513-521.
38. Cousin M. (1982) Presence and activity of Psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: A review. J Food Protect 45:172-207.

39. Cowley F, Barber D, Houlihan A, Poppi D. (2015). Immediate and residual effects of heat stress and restricted intake on milk protein and casein composition and energy metabolism. J Dairy Sci 98:2356-2368
40. Cox M. (1993). The significance of psychrotrophic *Pseudomonas* in dairy products. Aust J Dairy Technol 48: 108-113.
41. Cromie S. (1992): Psychrotrophs and their enzyme residues in. cheese milk. Aust. J Dairy Technol. 47: 96-100
42. Cronin U, Wilkinson M. (2008). *Bacillus cereus* endospores exhibit a heterogeneous response to heat treatment and low-temperature storage. Food Microbiol 25 (2): 235-243.
43. Cziszter L, Acatincai S, Neciu F, Neamt R, Ilie D, Costin N, Gavojdian D, Tripon I. (2012). The influence of season on the cow milk quantity, quality and hygiene. J An Sci Biotech 45:305-312.
44. Davies D, and Law A. (1977). The composition of whole casein from the milk of Ayrshire cows. J Dairy Res 44:447.
45. Delucchi I, Cabrera J, Cartaya A. (2008). En: Por una Lechería eficiente. Jornada de Lechería. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA), La Estanzuela, Serie Actividades de Difusión Nro. 548. Florida – Uruguay.
46. De Haas Y, Barkema H, Veerkamp R. (2002). The Effect of Pathogen-Specific Clinical Mastitis on the Lactation Curve for Somatic Cell Count. J Dairy Sci 85:1314-1323.
47. De Oliveira, Favarin L, Luchese R, McIntosh D. (2015). Psychrotrophic bacteria in milk: How much do we really know? Brazilian Journal of Microbiology 46 (2):313-321
48. DePeters E, Ferguson J. (1992). Nonprotein Nitrogen and Protein Distribution in the Milk of Cows J Dairy Sci 75: 3192-3209.
49. De Torres E. (2010). Estudio de la evolución del recuento celular y el aislamiento bacteriano durante la lactancia en vacas lecheras. Tesis de maestría en producción animal. Facultad de Veterinaria, UdelaR. Uruguay.
50. De Vries A, Steenholdt C and Risco C. (2005). Pregnancy rates and milk production in natural service and artificially inseminated dairy herds in Florida and Georgia. J Dairy Sci 88:948-956.
51. Deeth H. (2006). Lipoprotein lipase and lipolysis in milk. Int Dairy J 16:555-562.
52. Devold T, Brovold M, Langsrud T, and Vegarud G. (2000). Size of native and heated casein micelles, content of protein and minerals in milk from Norwegian Red cattle. Effect of milk protein polymorphism and different feeding regimens. Int Dairy J 10:313-323.
53. Dirección de Estadísticas Agropecuarias (DIEA). Anuario Estadístico 2015. Montevideo-Uruguay. Disponible

en:http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,diea,diea-anuario-2015,O,es,0. Consultado: 10 de marzo de 2016.

54. Dillon P, Berry D, Evans R, Buckley F, Horan B. (2006). Consequences of Genetic Selection for Increased Milk Production in European Seasonal Pasture Based Systems of Milk Production. Livest Sci 99: 141-158.
55. Dohoo I, Meek A. (1982). Somatic cell counts in bovine milk. Can Vet J. 23:119-125.
56. Dos Santos J, Netto dos Santos K, Gentilini E, Sordelli D, de Freire Bastos M. (2002). Phenotypic and genetic characterisation of bacteriocin-producing strains of *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis. Vet Microbiol 85: 133-144.
57. Dufour S, Dohoo E, Barkema H, DesCoteaux L, DeVries J, Reyher, Roy J, Scholl. (2012). Manageable risk factors associated with the lactational incidence, elimination, and prevalence of *Staphylococcus aureus* intramammary infections in dairy cows. J Dairy Sci 95 (3):1283–1300.
58. Eberhart R, Hutchinson L, y Spencer S. (1982). Relationships of bulk tank somatic cell counts to prevalence of intramammary infection and to indices of herd production. J Food Prot 45:1125.
59. Elmoslemany A, Keefe G, Dohoo I, Wichtel J, Stryhn H, Dingwell R. (2010). The association between bulk tank milk analysis for raw milk quality and on-farm management practices. Prev Vet Med 95:32-40.
60. Elmoslemany A, Keefe G, Dohoo I, Jayarao B (2009). Risk factors for bacteriological quality of bulk tank milk in Prince Edward Island dairy herds. Part 1: Overall risk factors. J Dairy Sci 92:2634–2643
61. European Union. Regulation (EC) Nº 853/of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004.Laying down specific hygiene rules for food of animal origin. Official Journal of the European Union 47:L226/22-L226/82.
62. Fabro M. (2011). Aseguramiento de la calidad en las mediciones involucradas en sistemas de pago de leche. Seminario calidad de leche, Instituto Nacional de la Leche (INALE), 19 octubre. Universidad Católica del Uruguay, Uruguay.
63. Fajardo-Lira C, Oria M, Hayes K, Nielsen S. (2000) Effect of psychrotrophic bacteria and of an isolated protease from *Pseudomonas fluorescens* M3/6 on the plasmin system of fresh milk. J Dairy Sci 83:2190-2199.
64. Faka Lewis M, Grandison A, Deeth H. (2009). The effect of free Ca2þ on the heat stability and other characteristics of low-heat skim milk powder. Int Dairy J 19: 386–392.
65. FAO/OMS (2001). Procesos en el sector primario que influyen en la calidad del producto final. Garantía de la inocuidad y calidad de los

alimentos: Directrices para el fortalecimiento de los Sistemas Nacionales de Control de los Alimentos. Consultado 20 de febrero de 2015. Disponible en: https://www.assal.gov.ar/assa/userfiles/file/fortalecimiento_de_los_sist_nacionales.pdf.

66. Farrell Jr. H, Malin E, Brown E, Qi P. (2006). Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology? Current Opinion in Colloid and Interface. Science 11: 135-147.
67. Faye B, Perochon L, Dorr N, and Gasqui P. (1998). Relationship between individual-cow udder health status in early lactation and dairy cow characteristics in Brittany France. Vet. Res. 29:31-46.
68. Ferreira F, De Vries A. (2015). Effects of season and herd milk volume on somatic cell counts of Florida dairy farms. J Dairy Sci 98:1-16.
69. FIL-IDF. (1993). Cheese yield and Factors Affecting its control. Proceedings of the IDF Seminar, Cork Ireland. 540 p.
70. FIL-IDF. (1991). Lait et produits laitiers. Dénombrements des microorganismes, comptage des colonies a 30°C. FIL 100B. Fédération Internationale de Laiterie, Brussels, Belgium.
71. Forsbäck L, Lindmark-Mansson H, Andren A, Svennersten-Sjaunja K. (2010). Evaluation of quality changes in udder quarter milk from cows with low-to-moderate somatic cell counts. Animal 4 (4): 617-626.
72. Fox P, McSweeney P. (2013) Advanced dairy chemistry. Ed. Springer, 4ª ed. New York.
73. Fox P, Zadoks R, Gaskins C. (2005) Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. Vet Microbiol 107:295 299
74. Fox L, Gay J. (1993). Contagius mastitis. Vet. Clin. North Am. Food Animal Practice 9:475-48.
75. Gallardo M. (2006). Alimentación y composición química de la leche. INTA Rafaela. Argentina, 10 p. Disponible en: http// www.produccion animal.com.ar. Consultado: 21/01/2016.
76. Garcia Armesto M, Sutherland A. (1997): Temperature characterization of psychrotrophic and mesophilic Bacillus species from milk. J Dairy Res 64: 261-270.
77. Gebrte-Egziabher A, Humbert E, Blankenagel G. (1980). Hydrolysis of milk proteins by microbial enzymes. J Food Prot 43(9):709-712.
78. Gianneechini R, Concha C, Rivero R, Gil J, Delucci I, Moreno Lopez J. (2005). Prevalencia y etiología de mastitis subclinica en rodeos de la cuenca lechera Sur de Uruguay". XII Congreso Latinoamericano de Buiatria y VII Jornadas Chilenas de Buiatría, 15- 18 de noviembre Valdivia, Chile.
79. Gianneechini R, Parietti I y De María P. (2002a). "Evaluación de pérdidas económicas relacionadas a mastitis para establecimientos

lecheros en Uruguay". Jornada de Lechería, Junio 2002. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA), La Estanzuela, Serie Actividades de Difusión Nro. 287. Colonia - Uruguay.

80. Gianneechini R, Concha C, Rivero R, Delucci I, Moreno-López J. (2002b). Occurrence of clinical and subclinical mastitis in dairy herds in the west littoral region in Uruguay. Acta Vet Scand, 43:221-230.
81. Gillespie B, Lewis L, Boonyayatra S, Maxwell M, Saxton A, Oliver S, Almeida R. (2012). Short communication: Evaluation of bulk tank milk microbiological quality of nine dairy farms in Tennessee. J Dairy Sci 95:4275–4279.
82. Glantz M, Devold T, Vegarud G, Lindmark Månsson H, Stålhammar H, Paulsson M. (2010). Importance of casein micelle size and milk composition for milk gelation. J Dairy Sci 93:1444–1451
83. Gleeson D, O'Connell A, and Jordan K. (2013). Review of potential sources and control of thermoduric bacteria in bulk-tank milk. Irish J. Agr. Food Res. 52:217-227.
84. Green M, Bradley A, Newton H, Browne W. (2006). Seasonal variation of bulk milk somatic cell counts in UK dairy herds: Investigations of the summer rise. Prev Vet Med 74: 293-308.
85. Griffiths M. (1992). Bacillus cereus in liquid milk and other milk products. Int. Dairy Fed. 275: 36–39.
86. Guerrero L, Román S, Pacheco L. (2003). Proteolysis during cold storage of refrigerated raw milk. Effect of proteolytic enzymes on casein integrit. FCV-LUZ 3 (13): 187-192.
87. Halasa T, Nielen M, De Roos APW, Van Hoorne R, de Jong G, Lam TJGM, Van Werven T, Hogeveen H. (2009). Production loss due to new subclinical mastitis in Dutch dairy cows estimated with a test-day model. J Dairy Sci. 92:599-606.
88. Han H, JiaQi W, FaDi L, DengPan B, LinYun V and RuiLian C. (2011). Responses of cultured bovine mammary epithelial cells to heat stress. J Agric Biotechnol 19:287-293.
89. Hand K, Godkin A and Kelton D. (2012). Milk production and somatic cell counts: A cow-level analysis. J Dairy Sci 95:1358- 1362.
90. Hantsis-Zacharov E, Halpern M. (2007) Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. Appl Environ Microbiol 73:7162-7168
91. Harmon R. (2001). Somatic Cell Count: A primer. En: National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings. pp: 3-9.
92. Harmon R. (1994). Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. J Dairy Sci 77:2103.
93. Haug A, Hostmark A, Harstad O. (2007). Bovine milk in human nutrition. A review. Lipids in Health and Disease 6:25.
94. Haveri M, Hovinen M, Roslöf A, Pyörälä S. (2008). Molecular types and genetic profiles of *Staphylococcus aureus* strains isolated from

bovine intramammary infections and extramammary sites. J Clin Microbiol 46(11): 3728-3735.
95. Hayes M, Ralyea R, Murphy S, Carey N, Scarlett J, Boor K. (2001) Identification and characterization of elevated microbial counts in bulk tank raw milk. J Dairy Sci 84:292-298.
96. Heck J, Van Valenberg H, Dijkstra J, Van Hooijdonk A. (2009). Seasonal variation in the Dutch bovine raw milk composition. J Dairy Sci. 92:4745-4755.
97. Hernández J, Bedolla J. (2008). Importancia del conteo de células somáticas en calidad de la leche. Red vet. 9:1-34.
98. Hill B, Smythe B, Lindsay D, Shepherd J. (2012). Microbiology of raw milk in New Zealand. International J Food Microbiol 157:305-308.
99. Hirigoyen D, Arenas D, Constantin M, Abelenda C, Báez P. Perfil estacional de la leche en uruguay y la relacion de sus componentes (2012). XL Jornadas Buiatría Paysandú, 14-15 de Junio, Paysandú, Uruguay, pp: 158.
100. Hogan J and Smith K. (1997). Bacteria counts in sawdust bedding. J Dairy Sci 80:1600-1605.
101. Holm C, Jepsen L, Larsen M, Jespersen L. (2004): Predominant microflora of Downgraded Danish Bulk Tank Milk. J Dairy Sci 87:1151-1157.
102. Hull R, Toyne S, Haynes I and Lehmann F. (1992). Thermoduric bacteria: A re-emerging problem in cheesemaking. Aust J Dairy Technol 47:91–94.
103. Hunt K, Williams J, Shafii B, Hunt M, Behre R, Ting R, Mc Guire K, Mc Guire A. (2013). Mastitis Is Associated with Increased Free Fatty Acids, Somatic Cell Count, and Interleukin-8 Concentrations in Human Milk. Breastfeeding Medicine 8 (1): 105-110.
104. Innocente y Biasutti. (2013). Automatic milking systems in the Protected Designation of Origin Montasio cheese production chain: Effects on milk and cheese quality. J Dairy Sci 96 :740-751
105. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Precipitación y evaporación, estación INIA Salto Grande. Disponible: http://www.inia.uy/
Consultado: enero 2012.
106. Instituto nacional de la leche (INALE). (2013). Información del Uruguay, exportaciones, productos y destinos. Disponible en: http://www.inale.org/innovaportal/v/40/4/innova.front/productos.html Consultado el 28 de febrero de 2014.
107. Instituto Nacional de la leche (INALE). Informe anual de situación y perspectivas de la lechería uruguaya, período Enero. Diciembre 2014. Disponible en: http://www.inale.org/innovaportal/file/4059/1/informe-de-coyuntura-inale-2014.pdf. Consultado: 5 de febrero de 2016.

108. Janstová B, Drackova M, Vorlova L. (2006). Effect of Bacillus cereus enzymes on the milk quality following Ultra High Temperature processing. Acta Veterinaria Brno 75:601-609
109. Jay J, Loessner M, Golden D. (2005) Microbiología Moderna de los Alimentos. ed.5ª, Acribia, Zaragoza España.
110. Jayarao B, Pillai S, Sawant A, Wolfgang D, Hegde N. (2004) Guidelines for monitoring bulk tank milk, somatic cell and bacterial counts. J Dairy Sci 87:3561-3573.
111. Jorgensen H, Mork D, Caugant A, Kearns A, Rovih M. Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strain from Norwegian bulk milk. (2005a). Appl Environ Microb 12 (1):8652-8661
112. Jorgensen H, Mork D, Rorvik L. (2005b).The Occurrence of *Staphylococcus aureus* on a Farm with Small-Scale Production of Raw Milk Cheese. J Dairy Sci 88:3810-3817
113. Julien M, Dion P, Lafreniere C, Antoun H, and Drouin P. (2008). Sources of Clostridia in raw milk on farms. Appl. Environ. Microb. 74:6348-6357.
114. Kadzere C, Murphy M, Silanikove N and Maltz E. (2002). Heat stress in lactating dairy cows: a review. Livest Prod Sci 77: 59-91.
115. Katz G, Merin U, Bezman D, Lavie S, Lemberskiy-Kuzin L, Leitner G. (2016). Real-time evaluation of individual cow milk for higher cheese-milk quality with increased cheese yield. J. Dairy Sci. 99:1-10.
116. Keefe G. (2012) Update on control of *S. aureus* and *S. agalactiae* for management of mastitis. Veterinary Clinics of North America: Food Anim Pract 28:203-216.
117. Kefford B, Christian M, Sutherland B, Mayes J, Grainger C. (1995). Seasonal influences on Cheddar cheese manufacture: influence of diet quality and stage of lactation. J Dairy Res 62:529-537.
118. Kolver E. (2003). Nutritional limitations to increased production on pasture-based systems. P Nutr Soc, 62: 291-300.
119. Kroeker, E.; Ng-Kwai-Hang, K.; Hayes, J.; Moxley, J. (1985). Effects of environmental factors and milk protein polymorphism on composition of casein fraction in bovine milk. J Dairy Sci. 68: 1752-1757.
120. Le Roux Y, Laurent F Moussaoui F. (2003). Polymorphonuclear proteolytic activity and milk composition change. Vet Res 34:629–645.
121. Leitner G, Lavi Y, Merin U, Lemberskiy-Kuzin L, Katz G. (2011). Online evaluation of milk quality according to coagulation properties for its optimal distribution for industrial applications. J. Dairy Sci. 94:2923-2932.
122. Leitner G, Krifucks O, Merin U, Lavi Y, Silanikove N. (2006). Interactions between bacteria type, proteolysis of casein and physico-chemical properties of bovine milk. Int Dairy J. 16 (6): 648-654.

123. Leriche F, Fayolle K. (2012). No seasonal effect on culturable pseudomonads in fresh milks from cattle herds. J Dairy Sci 95:2299-2306.
124. Li N, Richoux R, Boutinaud M, Martin P, Gagnaire V. 2014. Role of somatic cells on dairy processes and products: a review. Dairy Sci Technol 94:517–538.
125. Lievaart J, Barkema H. Kremer W, Van den Broek J. Verheijden J, Heesterbeek J. (2007). Effect of herd characteristics, management practices, and season on different categories of the herd somatic cell count. J Dairy Sci 90:4137-4144.
126. Lin S, Schraft H, Odumeru J and Griffiths M. (1998). Identification of contamination sources of *Bacillus cereus* in pasteurized milk. Int. J. Food Microbiol. 43:159-171.
127. Lopez Benavides M, Williamson J, Lacy-Hulbert S, Cursons R. (2009). Heifer teats sprayed in the dry period with an iodine teat sanitizer have reduced *Streptococcus uberis* teat-end contamination and less *Streptococcus uberis* intramammary infections at calving. Vet Microbiol 134:186-191.
128. Maas J, France J, McBride B. (1997). Model of milk protein synthesis. A mechanistic model of milk protein synthesis in the lactating bovine mammary gland. Journal of Theoretical Biology 187: 363-378.
129. Mackle T, Bryant A, Petch S, Hill J, Auldist M. (1999). Nutritional influences on the Composition of Milk from Cows of Different Proteins Phenotypes in New Zealand. J Dairy Sci. 82:172-180.
130. Magnusson M, Svensson B, Kolstrup C, Christiansson A. (2007). *Bacillus cereus* in Free-Stall Bedding. J Dairy Sci 90:5473-5482.
131. Martins M, Pinto C, Rocha R, de Araújo E, Vanetti M. (2006). Genetic diversity of Gram-negative, proteolytic, psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. Int J Food Microbiol 111: 144–148.
132. Matta H, Punj V. (1999). Isolation and identification of lipolytic, psychrotrophic, spore forming bacteria from raw milk. Int J Dairy Technol 52:59-62.
133. Mayne C, Thomas C. (1994). Sistemas de manejo de pastoreo. En: Broster W, Phipps R, Johnson C. (1994). Principios y prácticas de la alimentación de vacas lecheras. Ed. Hemisferio Sur, Montevideo, Uruguay. Cap 9, pp: 239-277.
134. Maziero M, Bersot L. (2011). *Bacillus cereus* in dairy products – a revision. Rev. Inst. Latic 381 (66): 5-12.
135. Mcphee J, Griffiths M. (2011). Psychrotrophic bacteria *Pseudomonas* spp. En: John, W.F (2011). Encyclopedia of Dairy Sciences. Ed. Academic Press, 2^{a} ed., San Diego, pp 379-383.
136. Meer R, Baker J, Bodyfelt F, Griffiths M. 1991. Psichrotrophic Bacillus spp. In fluid milk products: A Review. J Food Protect 11 (54): 969-979.

137. Mendoza A. (2010). Manipulación de la composición de la leche a través de la alimentación. Simposio: Claves para el manejo nutricional de las vacas de alto potencial. 15 de abril. Colonia, Uruguay. pp: 29-58.
138. Merlot E. (2004). Conséquences du stress sur la function inmunitaire chez les animaux d'elevage. INRA Prod Anim 17(4): 255-264.
139. Mhone T, Matope G, Saidi P. (2011). Aerobic bacterial, coliform, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* counts of raw and processed milk from selected smallholder dairy farms of Zimbabwe. Int J Food Microbiol 151: 223–228.
140. Miller G, Bartlett P, Lance S, Anderson J, Heider L. (1993). Costs of clinical mastitis and mastitis prevention in dairy herds. J Am Vet Med Assoc 202:1230-1236.
141. Ministerio Ganadería Agricultura y Pesca. (2013). Decreto 359/13. Determinación de un sistema nacional de calidad de leche a los efectos de su posterior procesamiento. Disponible en: http://www.impo.com.uy/bases/decretos/359-2013. Consultado: marzo 2016.
142. Ministerio de agroindustria de la Nación Argentina (MINAGRI). Estadísticas agropecuarias. Disponible en: http://www.minagri.gob.ar/site/_subsecretaria_de_lecheria/lecheria/07_Esta%C3%ADsticas/index.php . Consultado: marzo de 2016.
143. Ministerio de Salud Pública (MSP). (1994). Reglamento Bromatológico Nacional. Decreto Nº 315/994 de fecha 05/07/1994. 2ª ed., Montevideo, IMPO.
144. Morse D, DeLorenzo M, Wilcox C, Collier R, Natzke R, and Bray D. (1988). Climatic effects on occurrence of clinical mastitis. J Dairy Sci 71:848 853.
145. Murphy S and Boor K. (2000). Trouble-shooting sources and causes of high bacteria counts in raw milk. Dairy Food Environ. Sanit. 20:606–611.
146. Murphy J, O'Brien, B. (1997). Quality milk for processing? The production technology. En: Proceedings of national dairy conference. Dublin.Teagasc. pp: 54-83.
147. Ng-Kwai-Hang K, Hayes J, Moxley J, Monardes H. (1987). Variation in milk protein concentration associated with genetic polymorphism and environmental factors. J Dairy Sci 69:22-26.
148. National Research Council (NRC). (2001). Nutrient requirements of dairy cattle. 7th ed. Ed.National Academy Press, Washington D.C.
149. Olde Riekerink R, Barkema H, Stryhn H. (2007). The Effect of Season on Somatic Cell Count and the Incidence of Clinical Mastitis. J Dairy Sci 90:1704-1715.

150. Olde Riekerink R, Barkema H, Veenstra S, Poole D, Dingwell R, Keefe G (2006). Prevalence of contagious mastitis pathogens in bulk tank milk in Prince Edward Island. Can Vet J 47:567-572.
151. Olechnowicz J, Jaskowski J. (2012) Somatic cells count in cow's bulk tank milk. J Vet Med Sci 74:681–686.
152. Oleggini G, Ely L, Smith J. (2001). Effect of Region and Herd Size on Dairy Herd Performance Parameters. J Dairy Sci 84:1044-1050.
153. Oliver S, Sordillo M. (1988). Udeer Health in the Periparturient Period. J Dairy Sci 71:2584-2606.
154. Ominski, K, Kennedy A, Wittenberg K, Nia S. 2002. Physiological and production responses to feeding schedule in lactating dairy cows exposed to short-term, moderate heat stress. J. Dairy Sci. 85:730–737.
155. Ozrenk E, Selcuk S. (2008). The effect of seasonal variation on the composition of cow milk in Van Province. Pakistan. J Nutr 7 (1): 161 – 164.
156. Pighetti G, Petersson-Wolfe C, Bewley J, Nickerson S, Ward S, DeVries A, Oliver S. En: National Mastitis Council, 54th.Annual Meeting Proceedings, Memphis, Tennessee, 1-3 febrero. pp: 213-214.
157. Pinto M, Vega S, León S. (1998). Métodos de análisis de la leche y derivados. Ed. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
158. Pires M, Orellana G and Gatti C. (1999). Rennet coagulation of casein micelles and heated casein micelles: action of Ca2+ and pH. Food Hydrocolloids 13 (3): 235-238.
159. Pitkälä A, Haveri M, Pyörälä S, Myllys V, Honkanen-Buzalski T. (2004). Bovine mastitis in Finland 2001- Prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. J Dairy Sci 87:2433-2441.
160. Plozza K, Lievaart J, Pottsb G, Barkema H. (2011). Subclinical mastitis and associated risk factors on dairy farms in New South Wales. Aust Vet J 89: 41-46.
161. Politis I, Ng-Kwai-Hang K. (1988). Association between somatic cell count of milk and cheese-yielding capacity. J Dairy Sci 71:1720-1727.
162. Quinn P, Markey B, Carter M, Donnelly W, Leonard F. (2008) Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias. Ed. Acribia, Zaragoza, España.
163. Raats D, Offek M, Minz D. (2011). Molecular analysis of bacterial communities in raw cow milk and the impact of refrigeration on its structure and dynamics. Food Microbiol. 28:465-471.
164. Rabello R, Souza C, Duarte R, Lopes R, Teixeira L, Castro A. (2005). Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis in Rio de Janeiro, Brazil. J Dairy Sci 88:3211-3219.
165. Rearte, D. (1992). Alimentación y composición de leche en los sistemas pastoriles. INTA E.E.A Balcarce. Cerbas. 94p.

166. Reginensi S, González M, Olivera J, Sosa M, Juliano P, Bermúdez J. (2011). RAPD-based screening for spore-forming bacterial populations in Uruguayan commercial powdered milk. Inter J Food Microbiol 148: 36–41
167. Reksen O, Solverod L, Osteras O. (2007) Relationships between milk culture results and milk yield in Norwegian dairy cattle. J Dairy Sci 90:4670 4678.
168. Requena F, Agüera E, Requena F. (2007). Milk of casein of genetic in the Frison bovine. Red vet.8 (1):1-9.
169. Rhoads M. L, Rhoads R, VanBaale M, Collier R, Sanders S, Weber W, Crooker B, and Baumgard L. (2009). Effects of heat stress and plane of nutrition on lactating Holstein cows: I. Production, metabolism, and aspects of circulating somatotropin. J Dairy Sci 92:1986-1997.
170. Roberson, J.; Fox, L.; Hancock, D.; Gay, J. (1994) Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. J Dairy Sci 77:3354-3364.
171. Rogers S, Mitchell G. (1994). The relationship between somatic cell count, composition and manufacturing properties of bulk milk. 6. Cheddar cheese and skim-milk yogurt. Aust J Dairy Technol 49:70–74.
172. Roman L, Saravia C, Astigarraga L, Bentancur O, Acosta Y, Pla M, Mendoza A, Morales T, La Manna A. (2014). El Acceso a Sombra Asociado o no con Aspersión y Ventilación Mejora las Variables Fisiológicas y el Desempeño Productivo de Vacas Holando en el Suroeste de Uruguay. En: Manejo del Stress térmico en ganado lechero. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA), La Estanzuela, Serie Actividades de Difusión N°728. Colonia – Uruguay.
173. Ruegg P. (2012). New perspectives in Udder Health Management. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice 28:149-163.
174. Saeman A, Verdi R, Galton D, Barbano D. (1988) Effect of mastitis on proteolytic activity in bovine milk. J Dairy Sci 71:505-512.
175. Samarzija D, Zamberlin S, Pogacic T. (2012). Psychrotrophic bacteria and their negative effects on milk and dairy products quality. Mljekarstvo 62:77-95.
176. Saran A, Chaffer M. (2000). Agentes causantes de mastitis en: Mastitis y calidad de leche. Ed.Intermédica, Buenos Aires.
177. Saravia C, Astigarraga L, Van Lier E, Bentancur O. (2011). Impacto de las olas de calor en vacas lecheras en Salto (Uruguay). Agrociencia 15 (1): 93-102
178. Sargeant J, Schukken Y, and Leslie K. (1998). Ontario bulk milk somatic cell count reduction program: Progress and outlook. J Dairy Sci 81:1545-1554.

179. Schepers A, Lam T, Schukken Y, Wilmink J, Hanekamp W. (1997). Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters. J Dairy Sci 80:1833-1840.
180. Schwarz D, Diesterbeck U, Konig S, Brugemann K, Schlez K, Zschock M, Wolter W, Czerny C. (2011) Flow cytometric differential cell counts in milk for the evaluation of inflammatory reactions in clinically healthy and subclinically infected bovine mammary glands. J Dairy Sci 94:5033–5044
181. Scott R. (1991). Fabricación de queso. Acribia. Zaragoza, España. 520 p.
182. Seegers H, Fourichon C, Beaudeau F. (2003) Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. Vet Res. 34:475 491.
183. Sevi A, Taibi L, Albenzio M, Annicchiarico G and Muscio A. (2001). Airspace effects on the yield and quality of ewe milk. J Dairy Sci 84:2632-2640.
184. Shaheen R, Svensson B, Anderson M, Christiansson A, Salkinoja-Salonen M. (2010). Persistence strategies of *Bacillus cereus* spores isolated from dairy silo tanks. Food Microbiology 27: 347-355.
185. Sharma N, Singh N, Bhadwal M. (2011) Relationship of Somatic Cell Count and Mastitis: An Overview. Asian-Aust. J Anim Sci 24:429- 438.
186. Signorini M, Sequeira G, Bonazza J, Dalla Santina R, Otero J, Rosmini M. (2003). Variación estacional en los principales indicadores de higiene de leche cruda de un tambo de la cuenca central. FAVE-Ciencias Veterinarias. 2:97-110.
187. Silvestre A, Martins A, Santos V, Ginja M, Colaço J. (2009). Lactation curves for milk, fat and protein in dairy cows: A full approach. Livest Sci, 122: 308–313.
188. Slaghuis B, Te Giffel M, Beumer R and Andre´ G. (1997). Effect of pasturing on the incidence of Bacillus cereus spores in raw milk. Int. Dairy J 7:201-205.
189. Smith J, Ely L, Chapa. M. (2000). Effects of region, herd size, and milk production on reasons cows leave the herd. J Dairy Sci 83:2980-2987.
190. Smith K, Hogan J. (1995). Epidemiology of mastitis. 3rd International Mastitis Seminar, 28 may - 1june, Tel Aviv, Israel.
191. Sutherland A, Murdoch R. (1994). Seasonal occurrence of psychrotrophic Bacillus species in raw milk, and studies on the interactions with mesophilic Bacillus sp. Inte J Food Microbiol 21: 279-292.
192. Sutton J, Morant S. (1989). A review of the potential of nutrition to modify milk fat and protein Livest Prod Sci 23: 219-237

193. Svensson B, Ekelund K, Ogura H, Christiansson A. (2004). Characterisation of *Bacillus cereus* isolated from milk silo tanks at eight different dairy plants. Int Dairy J 14:17-27.
194. Svensson B, Eneroth A, Brendehaug J, Molin G and Christiansson A. (2000). Involvement of a pasteurizer in the contamination of milk by *Bacillus cereus* in a commercial dairy plant. J Dairy Res 67:455-460.
195. Swinkels J., Hogeveen H and Zadocks R. (2005). A partial budget model to estimate economic benefits of lactational treatment of subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis. J Dairy Sci 88 (12):4273-4287.
196. Te Giffel M, Beumer R, Slaghuis B and Rombouts F. (1995). Occurrence and characterization of (psychrotrophic) *Bacillus cereus* on farms in the Netherlands. Neth. Milk Dairy J 49:125-138.
197. Uruguay XXI. Promoción de Inversiones y exportaciones. Informe Sector Lácteo. Junio 2015. Disponible en: http://www.uruguayxxi.gub.uy/informacion/wpcontent/uploads/sites/9/2015/06/Informe-Sector-Lacteo-Mayo-2015.pdf. Consultado: 9 de febrero de 2016.
198. Van Schaik G, Lotem M and Schukken Y. (2002). Trends in somatic cell counts, bacterial counts, and antibiotic residue violations in New York State during 1999-2000. J Dairy Sci 85:782-789.
199. Vianna P, Mazal G, Santos M, Bolini H, Gigante M. (2008). Microbial and sensory changes throughout the ripening of prato cheese made from milk with different levels of somatic cells. J Dairy Sci 91:1743-1750.
200. Vilar M, Rodriguez Otero J, San Juan M, Dieguez F, Varela M, YUS M. (2011). Implementation of HACCP to control the influence of milking equipment and cooling tank on the milk quality. Trends Food Sci Tech 20:1-9.
201. Vissers M, Te Giffel M, Driehuis F, De Jong P, Lankveld J. (2007). Minimizing the Level of *Bacillus cereus* Spores in Farm Tank Milk. J Dairy Sci 90:3286–3293.
202. Vithanage N, Dissanayake M, Bolge G, Palombo E, Yeager TR, Datta N. (2016). Biodiversity of culturable psychrotrophic microbiota in raw milk attributable to refrigeration conditions, seasonality and their spoilage potential. Int Dairy J 57: 80-90.
203. Walstra P, Geurts T, Noomen A, Jellema A. (2001). Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos. Ed. Acribia. Zaragosa, España.
204. Walstra P, Wouters J. and Geurts T. (2006). Dairy Science and Technology. Ed. Taylor and Francis. New York.
205. Wellenberg G, Van der Poel W y Van Oirschot J. (2002). Viral infections and bovine. Vet Microbiol 88: 27-45.

206. Wells S, Ott S, Hillberg Seitzinger A. (1998). Key health issues for dairy cattle-new and old. Symposium: emerging health issues. J Dairy Sci 81: 3029-3035.
207. West J. (2003). Effects of heat-stress on production in dairy cattle. J Dairy Sci 86:2131-2144.
208. WHO/FAO. (2008). Codex Alimentarius. Animal food production. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations.
209. Zadoks R, Allore H, Barkema H, Sampimon O, Wellenberg G, Grohn, Y, Schukken, Y. (2001) Cow and Quarter, Level risk factors for *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* Mastitis. J Dairy Sci 84:2649-2663.
210. Zeng S, Chen S, Bah B, Tesfai K. (2007). Effect of Extended Storage on Microbiological Quality, Somatic Cell Count, and Composition of Raw Goat Milk on a Farm. J Food Protect 5:1281-1285
211. Zhou G., Zheng D., Dou L., Yuang Z. (2010). Occurrence of psychrotolerant *Bacillus cereus* group strains in ice creams. Int J Food Microbiol. 137: 143-146.
212. Zucali M, Bava L, Tamburini A, Brasca M, Vanoni L, Sandrucci A. (2011) Effects of season, milking routine and cow cleanliness on bacterial and somatic cell counts of bulk tank milk. J Dairy Res 78:436-441.