

DETECCIÓN DE MASTITIS SUBCLÍNICA EN BOVINOS MESTIZOS DOBLE PROPÓSITO ORDEÑADOS EN FORMA MANUAL O MECÁNICA. COMPARACIÓN DE TRES PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

Detection of Subclinical Mastitis in Dual Purpose Bovines By Hand Milking or Milking Machine. Comparison of Three Diagnostic Tests

José F. Faría Reyes¹, Aleida García Urdaneta², Gerardo D'Pool¹, Kutchynskaya Valero Leal³, María Allara Cagnaso¹ y Geovany Angelosante¹

¹ Facultad de Ciencias Veterinarias. ² Facultad de Agronomía. ³ Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. Apartado 15252. Maracaibo 4005-A, Venezuela. E-mail: algarcia@luz.edu.ve

RESUMEN

Para detectar la presencia de mastitis subclínica en bovinos mestizos, ordeñados en forma manual (OM) o mecánica (OME), se analizaron 160 muestras de leche de cuarto, 80 de cada ordeño, recolectadas de 4 fincas del estado Zulia, Venezuela. En campo se aplicó la prueba de Mastitis California (CMT), y en el laboratorio, cultivo bacteriológico (CB) y conteo de células somáticas (CCS) con Somalite de Charm Sc®. La prevalencia de mastitis fue más elevada en animales de OME. Los agentes causales fueron *Staphylococcus coagulasa positiva* (SCP) (40,00%), *Staphylococcus coagulasa negativa* (SCN) (28,00%) y *Streptococcus* spp (17,00%) y para OM fueron SCN (40,63%), SCP (28,13%), y *Corynebacterium* spp (20,31%). Según CB, la prevalencia en cuartos de OM fue 58,67% y en OME 87,34%. Se encontró asociación ($P < 0,001$) entre infección y tipo de ordeño según chi-cuadrado. Para CMT la prevalencia en cuartos de OM fue 72% y 57%, para reacciones $\geq 1+$ y $\geq 2+$, respectivamente, mientras que para OME fueron 70% y 40%. Mayor correspondencia entre CB y CMT se obtuvo para reacciones $\geq 2+$ en cuartos de OM. Para OME los resultados del CMT fueron, para ambos umbrales, más bajos que para CB. Se determinó asociación ($P < 0,05$) entre CB y CMT según la prueba de Fisher, para ambos umbrales en cuartos de OM; para OME no hubo asociación ($P > 0,05$) para ningún umbral. Las muestras de OME alcanzaron CCS de 7.966.137,83 cel/mL y las de OM 730.527,57 cel/mL. Demostrándose con análisis de varianza que el ordeño tuvo efecto significativo ($P < 0,001$) en CCS. El coeficiente de correlación de Spearman para CMT y CCS fue $r = 0,42$ ($P < 0,001$) para cuartos de OM y $r = 0,55$ ($P < 0,001$) para los de OME.

Palabras clave: Mastitis subclínica, ordeño manual, ordeño mecánico, diagnóstico.

ABSTRACT

To detect the presence of subclinical mastitis in cattle hand milked (HM) and mechanically milked machine (MM), cross-bred cattle 160 milk samples were analyzed, 80 from HM and 80 from MM, collected in four (4) farms from Zulia state, Venezuela. At the farm level, California Mastitis Test (CMT) was performed and at the laboratory, bacteriological cultures (BC) were made as well as somatic cell counts (SCC). For the SCC, Somalite by Charm Sc® was used. The highest mastitis prevalence was in mechanically milked samples. The pathogen agents in MM were coagulase positive *Staphylococcus* (CPS) (40.00%), coagulase negative *Staphylococcus* (CNS) (28.00%) and *Streptococcus* spp (17.00%) whereas for HM were CNS (40.63%), CPS (28.13%) and *Corynebacterium* spp (20.31%). According to the BC, the prevalence in hand milked quarters was 58.67% and for milking machine was 87.34%. That association ($P < 0.001$) between infection and milking type by ji-square was found. The CMT prevalence for HM was 72% and 57% for $\geq 1+$ and $\geq 2+$ reactions respectively. For MM, were 70% and 57%. The major correlation between BC and CMT was to $\geq 2+$ reactions in HM. For MM the CMT results to both thresholds were less than BC. The association between BC and CMT ($P < 0.05$) was determined by Fisher test for both in HM, quarters, there was not association to MM ($P > 0.05$) for the thresholds. The SCC in MM was 7,966,137.83 cel/mL. In HM the SCC were 730,527.57 cel/mL. ANOVA indicated that the milking type had a significant effect in the SCC ($P < 0.001$). The Spearman correlation coefficient to CMT was $r = 0.42$ ($P < 0.001$) in HM quarters and $r = 0.55$ ($P < 0.001$) to MM quarters.

Key words: Subclinical mastitis, mechanical milking, manual milking, diagnosis.

INTRODUCCIÓN

La mastitis es una reacción inflamatoria de la glándula mamaria ocasionada por factores físicos, químicos, mecánicos o infecciosos, puede presentarse clínicamente en forma hiperguda, aguda, subaguda y crónica, sin embargo, el tipo más frecuente e importante es la forma subclínica [4, 18, 20, 22].

La mastitis subclínica es considerada un proceso multifactorial donde se conjugan factores propios del animal, factores relacionados con el agente causal y factores ambientales y de manejo, donde se incluye el ordeño, el cual juega un papel determinante en la presencia de la enfermedad [17, 18, 24, 29]. La National Mastitis Council [26], estima que entre un 70 a 80% de los casos de mastitis son debidos a técnicas inadecuadas de ordeño, caracterizada por pobres condiciones higiénico-sanitarias, falta de desinfección pre-ordeño y ordeños prolongados, sumándose en el caso del ordeño mecánico, aspectos como diseño, manejo y mantenimiento inapropiado de las máquinas [18, 24, 28].

En Venezuela la prevalencia de mastitis subclínica se ha estimado cercana a un 60% [1], atribuida principalmente a pobres condiciones higiénico-sanitarias, considerándose escaso el efecto del sistema y las características del ordeño. Sin embargo, la ganadería bovina en el país, y en una mayor proporción en el estado Zulia, es mestiza con características genéticas y fenotípicas particulares [30], por las cuales, la anatomía de la ubre y del pezón, así como el volumen de producción de leche, podrían hacer de éste un animal susceptible a la invasión de patógenos mastitogénicos, por la aplicación de una técnica inapropiada de ordeño. Diversas investigaciones realizadas en otros países han puesto en evidencia el impacto que puede tener las características del ordeño, la raza y la conformación de la ubre y del pezón sobre la mastitis [3, 6, 9, 17, 19, 25, 34].

La detección de mastitis subclínica puede realizarse mediante diversas pruebas diagnósticas, una de éstas es el cultivo bacteriológico de la leche proveniente de cada cuarto del animal, a través de la cual puede obtenerse un diagnóstico válido para el tratamiento y pronóstico de la mastitis bovina; sin embargo, esta prueba no es totalmente confiable, por cuanto, aun cuando se realice en laboratorios especializados, los resultados pueden verse afectados por un número importante de factores difíciles de controlar [7, 22].

Entre otras pruebas se encuentra la cuantificación de células somáticas, considerado uno de los métodos de referencia más utilizado actualmente para demostrar la inflamación de la glándula mamaria y la calidad de la leche producida, por lo que en muchos países el recuento electrónico de células somáticas ha sido incorporado a los esquemas de control de calidad de la leche [7, 10].

Para la rápida determinación de las células somáticas también se utilizan métodos indirectos, a través de la cuantificación del grado de reacción de los núcleos celulares con sus-

tancias de superficie activa, como la prueba de California para Mastitis (CMT), técnica que por su simplicidad, rapidez, economía, aplicabilidad en campo y efectividad, sobre todo en manos de operadores hábiles, sigue siendo la más usada en el país para el diagnóstico de la mastitis subclínica [7, 14, 15, 22, 24].

El objetivo de la presente investigación fue detectar la presencia de mastitis subclínica en bovinos mestizos doble propósito, de 4 fincas del estado Zulia, Venezuela, ordeñados rutinariamente en forma manual o mecánica, comparando los resultados obtenidos por cultivo bacteriológico, la prueba de California para mastitis (CMT) y el conteo de células somáticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fincas y animales

Para la realización del estudio se incluyeron 2 fincas (A y B) donde se realiza el ordeño rutinario de los animales en forma manual, y 2 (C y D) donde se utiliza un sistema de ordeño mecánico. La población total de cada una era de 760 animales para la finca A, 370 para la B, 550 para la C y 260 para la D. Todas las fincas se encuentran ubicadas en el estado Zulia, Venezuela. En cada una se seleccionaron aleatoriamente 10 bovinos mestizos, predominantemente de la raza mosaico Perijanero, mestizo Pardo Suizo y mestizo Holstein, que se encontraban entre el cuarto y sexto mes de lactación, para un total de 40 animales y 160 cuartos. Cada finca fue visitada en una ocasión por un médico veterinario quien examinaba previamente los animales para descartar mastitis clínica.

Prueba de California para mastitis (CMT)

Durante el ordeño vespertino se realizó la limpieza de los pezones con agua, jabón y solución iodada, para proceder a la aplicación de la prueba del CMT, lectura y registro de acuerdo a las especificaciones de Schalm y Noorlander [32].

Muestras de Leche

Se recolectaron 100 mL de leche, en recipientes plásticos estériles, de todos los cuartos individualmente, siguiendo las recomendaciones de la Internacional Dairy Federation [21]. Las muestras fueron transportadas en cavas con hielo hasta el laboratorio para su procesamiento en un tiempo no mayor a una hora, realizándose los análisis bacteriológicos y de conteo de células somáticas el mismo día.

Aislamiento e identificación de patógenos bacterianos

Para lograr el aislamiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas se utilizaron los medios de agar sangre (AS) y agar Mac Conkey (MC). Las muestras de leche fueron inoculadas mediante la técnica de siembra por superficie con asa calibrada (0,01 mL) estéril, posteriormente los medios de cultivo se incubaron a 35 - 37°C, en condiciones aeróbicas, durante

24 - 48 horas [5, 13, 27]. La identificación de los miembros del género *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium* y los pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* se realizó siguiendo esquemas y metodologías de identificación previamente descritos [12, 21, 23].

Contaje de Células Somáticas (CCS)

Para la estimación del número de células somáticas se utilizó el método rápido Somalite, los resultados fueron leídos en el LuminatorT o LUM-T Versión 6,08 (Charm Sciences INC®, USA), cuya calibración se realizó siguiendo las especificaciones del fabricante. El SomaLite es una prueba rápida diseñada para el tamizaje de células somáticas en leche cruda con resultados que tienen buena correlación con otros métodos como el recuento microscópico directo y el contaje electrónico de células somáticas [2]. En este método las células microbianas y libres de ATP son filtradas y descartadas, mientras que las células somáticas son capturadas en un filtro, posteriormente el ATP de las células somáticas es cuantificado por la medida de la luminiscencia. El equipo LuminatorT es calibrado para medir luminiscencia en unidades de células somáticas por mL.

Tratamiento de los Resultados

Se clasificaron como cuartos positivos a infección aquellos cuyas muestras de leche presentaron al menos un patógeno mastitogénico. La causa bacteriológica de la infección fue categorizada como **patógeno mayor** cuando se aislaron *Streptococcus*, *Staphylococcus* coagulasa positiva (SCP), *E.coli*, *Enterobacter* spp, *Klebsiella* spp, *Bacillus* spp, y **patógeno menor** al presentar *Staphylococcus* coagulasa negativa (SCN) y *Corynebacterium* spp. En los casos en que se aisló en la misma muestra un patógeno mayor y menor, el cuarto fue clasificado como infectado por patógeno mayor. Los resultados del CMT fueron recodificados como 0 (negativo), 1 (trazas), 2 (1+), 3 (2+) y 4 (3+) para su análisis.

Análisis Estadístico

La dependencia entre la presencia de infección detectada por el cultivo bacteriológico y el tipo de ordeño fue evaluada con el estadístico chi-cuadrado. Para determinar validez del CMT para la identificación de cuartos infectados, se calculó la sensibilidad, especificidad y efectividad para los valores umbrales de $\geq 1+$ y $\geq 2+$. La sensibilidad fue calculada como la proporción de cuartos positivos al cultivo que tenían valores para el CMT superiores al umbral seleccionado. La especificidad fue la proporción de cuartos negativos al cultivo que tenían valores de CMT por debajo del umbral evaluado y la efectividad fue la proporción de verdaderos positivos o negativos. Para determinar la asociación entre los resultados del cultivo y el CMT se aplicó la prueba exacta de Fisher, mientras que para determinar el grado de asociación entre los resultados del CMT y el contaje de células somáticas se calculó el coeficiente de correlación de Spearman.

El contaje de células somáticas (CCS) fue transformado calculando el valor del Log_{10} . A los valores resultantes se les aplicó análisis de la varianza en un diseño completamente aleatorizado, para detectar diferencias significativas en el CCS entre los ordeños, respondiendo al siguiente modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Valor ij-ésimo de la variable respuesta.

μ = Media Poblacional.

τ_i = Efecto del i-ésimo sistema de ordeño.

ε_{ij} = Componente de error asociada a la j-ésima repetición.

También se realizaron comparaciones en el CCS de acuerdo a las categorías microbiológicas de muestras sin crecimiento, con patógenos mayores y patógenos menores. Todos los análisis se realizaron utilizando el Statistical Analysis System (SAS), versión 8,1 [35].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del total de 160 cuartos sólo 2 (1,25%) se encontraban atrofiados, uno de un animal de ordeño manual y otro de ordeño mecánico, de los restantes 158 cuartos productivos, se logró realizar el análisis en 154 muestras de leche.

Cultivo bacteriológico

De los 154 cuartos estudiados 41 (26,63%) fueron clasificados como no infectados, y 113 (73,37%) como infectados, al lograrse en estos el aislamiento de al menos un patógeno mastitogénico. La prevalencia de infección fue superior en un 29% en los cuartos de animales ordeñados en forma mecánica, al encontrarse que de los 75 cuartos de los animales ordeñados manualmente 44 (58,67%) presentaron infección, mientras que 69 (87,34%) de los 79 cuartos de los animales ordeñados a máquina fueron positivos a ésta (TABLA I). La aplicación de la prueba chi-cuadrado permitió detectar, para la población estudiada, la existencia de una dependencia altamente significativa ($P < 0,001$), entre la presencia de infección y tipo de ordeño.

La mayor prevalencia de infección en cuartos de animales ordeñados en forma mecánica ha sido previamente reportada en el país. Ferraro y col. [15], encontraron que la frecuencia de infección subclínica en Venezuela, según resultados del cultivo, fue de 31,7% para cuartos ordeñados manualmente y 37,3% para los ordeñados a máquina, dando como posible explicación al hecho de que las máquinas de ordeño se constituyen en fómites y son, además, agentes traumáticos si no se someten a revisiones periódicas que garanticen un funcionamiento adecuado.

Neave y col. [28], al estudiar el efecto de la máquina de ordeño sobre el número de nuevas infecciones, reportaron un incremento de más del doble, causado por los cambios en las propiedades físicas de la máquina; afirmando, que aun cuando los principios involucrados no fueron establecidos, se creía que el incremento estaba asociado, aparentemente, con grandes fluctuaciones del vacío y las pulsaciones, señalando que es posible reducir la tasa de nuevas infecciones corrigiendo los defectos en el diseño de la máquina y/o la operación de la misma.

Identificación bacteriana

Los resultados de la identificación bacteriana evidenciaron que en los animales de ordeño manual el porcentaje de casos de infección atribuible a patógenos mayores (28,00%), fue menor al porcentaje causado por patógenos menores (30,67%), mientras que en los animales de ordeño mecánico el 68,35% de los casos fue causado por patógenos mayores y solo 18,99% por patógenos menores (TABLA I).

Las especies de *Staphylococcus* coagulasa negativa fueron las más aisladas (40,63%) para los animales de ordeño manual, seguido por *Staphylococcus* coagulasa positiva (28,13%) y *Corynebacterium* spp (20,31%), mientras que para los del mecánico, los aislamientos más comunes fueron *Staphylococcus* coagulasa positiva (40,00%), *Staphylococcus* coagulasa negativa (28,00%) y *Streptococcus* spp (17,00%) (TABLA II).

En otros estudios realizados en el país [1, 15, 31], sin discriminar el tipo de ordeño, se ha señalado al género *Staphylo-*

coccus como el agente más común en la producción de mastitis coincidiendo con los resultados del presente estudio.

La presencia de patógenos contagiosos (*Staphylococcus* coagulasa positiva y *Streptococcus* spp) en las muestras de ordeño mecánico podría estar favorecido por las lesiones causadas por la máquina de ordeño en los pezones. Neave y col. [28], han señalado que las lesiones en los pezones, causadas en muchos casos por la máquina de ordeño, influyen en la tasa de nuevas infecciones provocadas por patógenos contagiosos, afirmando además que la reducción de *S.aureus* lograda con prácticas de higiene sencillas es mucho menor en los pezones lesionados, lo que favorece la propagación de los mismos.

Prueba de California para Mastitis (CMT)

En la TABLA III se muestran los resultados obtenidos para el CMT. Del total de 154 cuartos evaluados 110 presentaron reacciones $\geq 1+$, y 75 tuvieron reacción $\geq 2+$. Para los animales ordeñados en forma manual se encontró que 54 de los 75 cuartos evaluados presentaron reacción al CMT $\geq 1+$, y 43 tuvieron reacción $\geq 2+$. Mientras que, para los animales ordeñados en forma mecánica 56 presentaron CMT $\geq 1+$, y 32 fueron de reacción $\geq 2+$.

Al considerarse como cuartos positivos a mastitis aquellos con reacción al CMT $\geq 2+$, se observó que los resultados obtenidos de acuerdo al tipo de ordeño coinciden con lo reportado por Ferraro y col [15], quienes encontraron una proporción de cuartos con reacción 2+ y 3+ mayor (34,82%) para los

TABLA I

DISTRIBUCIÓN DE CUARTOS CON INFECCIÓN EN BOVINOS MESTIZOS ORDEÑADOS EN FORMA MANUAL O MECÁNICA

Categoría	Ordeño Manual	%	Ordeño Mecánico	%	Total de Cuartos	%
Sin crecimiento	31	41,33	10	12,66	41	26,63
Patógenos Mayores	21	28,00	54	68,35	75	48,70
Patógenos Menores	23	30,67	15	18,99	38	24,67
Total con infección	44	58,67	69	87,34	113	73,37

TABLA II

GRUPOS BACTERIANOS AISLADOS EN LECHE DE CUARTO DE BOVINOS MESTIZOS ORDEÑADOS EN FORMA MANUAL O MECÁNICA

Aislamiento	Ordeño Manual	%	Ordeño Mecánico	%
SCP ¹	18	28,13	40	40,00
<i>Streptococcus</i> spp	1	1,56	17	17,00
Enterobacterias	1	1,56	3	3,00
SCN ²	26	40,63	28	28,00
<i>Bacillus</i> spp	5	7,81	5	5,00
<i>Corynebacterium</i> spp	13	20,31	7	7,00
Total	64	100,00	100	100,00

SCP¹: *Staphylococcus* coagulasa positiva. SCN²: *Staphylococcus* coagulasa negativa.

TABLA III
RESULTADOS PARA LA PRUEBA DE MASTITIS CALIFORNIA (CMT) APLICADA A MUESTRAS DE LECHE DE CUARTO DE BOVINOS MESTIZOS ORDEÑADOS EN FORMA MANUAL O MECÁNICA

Resultado	Ordeño Manual	%	Ordeño Mecánico	%	Total
Negativo	6	8	14	18	20
Trazas	15	20	9	11	24
1+	11	15	24	30	35
2+	15	20	16	20	31
3+	28	37	16	20	44
Total	75	100	79	100	154

animales sujetos a ordeño manual, con respecto a los ordeñados a máquina (29,64%). Siendo estos resultados contrario a lo encontrado con el cultivo bacteriológico, prueba con la que la incidencia de mastitis fue mayor para los cuartos de ordeño mecánico, en ambas investigaciones.

CMT y cultivo bacteriológico

Para el resultado global de prevalencia de mastitis subclínica, se encontró una mayor correspondencia entre el porcentaje de infección detectado con el cultivo bacteriológico (73,38%) y el CMT (71,43%) cuando se utilizó como umbral positivo las reacciones $\geq 1+$, pero al discriminar los resultados por tipo de ordeño, se encontró para los animales ordeñados en forma manual una mayor correspondencia entre las dos pruebas cuando se utilizó para el CMT el umbral de $\geq 2+$, mientras que para los animales de ordeño mecánico, para ambos umbrales del CMT, los resultados fueron más bajos que el encontrado con el cultivo bacteriológico. Una investigación reciente [16] señala que la sensibilidad del CMT, con relación a la presencia de *S.aureus* y *S.agalactiae* es de 66% y 72%, respectivamente, por lo que estima que el CMT no detecta aproximadamente un tercio de las infecciones causadas por estos patógenos, los cuales fueron aislados en un número importante en las muestras de leche provenientes de los animales ordeñados a máquina, ello podría explicar la poca correspondencia entre los resultados del cultivo bacteriológico y el CMT para estas muestras de leche.

Al discriminar los resultados del CMT, según el patógeno aislado, se encontró para las 44 muestras de ordeño manual con presencia de patógeno mayor o menor, que 6 (14%) fueron clasificadas con reacción de 1+, 9 (20%) con 2+ y 22 (50%) con 3+, esto coincide con lo señalado en diversas investigaciones, donde se afirma que una mayor reacción al CMT se debe corresponder con una mayor posibilidad de obtener cultivos positivos. Sin embargo, esto no ocurrió para las muestras de ordeño mecánico, por cuanto, de las 69 muestras con aislamiento de patógenos mayores o menores 22 (32%) de las muestras tuvieron reacción de 1+, 12 (18%) fueron de reacción 2+ y 14 (20%) de 3+ (TABLA IV).

Llama la atención que para los resultados globales presentados por Ferraro y col. [15], la reacción al CMT con mayor

frecuencia fue la de $\geq 1+$, ocurriendo esto mismo para las muestras obtenidas de los animales ordeñados en forma mecánica en la presente investigación, lo que indudablemente, en este último caso, provocó la contradicción de los resultados del CMT y el cultivo para el umbral de $\geq 2+$, esto podría indicar que sería prudente considerar los cuartos con reacción $\geq 1+$ como positivos a la presencia de mastitis subclínica.

A través de la aplicación de la prueba exacta de Fisher se logró determinar una asociación significativa ($P < 0,05$), entre los resultados del cultivo y el CMT en las muestras de ordeño manual y para ambos umbrales, mientras que para las muestras de ordeño mecánico la asociación no fue significativa ($P > 0,05$), para ninguno de los umbrales considerados.

Evaluación del CMT

Al evaluar el CMT como prueba para discriminar entre cuartos infectados y no infectados (TABLA V), se encontró que la sensibilidad de la prueba fue mayor para las muestras provenientes de los animales de ordeño manual, para ambos umbrales, mientras que, la especificidad fue más elevada para el umbral de $\geq 1+$, en las muestras de ordeño manual, y para el umbral de $\geq 2+$, para las de ordeño mecánico. De acuerdo a la efectividad obtenida es posible identificar correctamente el 68 y 67% de las muestras al utilizar los umbrales de $\geq 1+$ y $\geq 2+$, en el caso de las muestras de ordeño manual, mientras que, para las muestras de ordeño mecánico los valores correspondieron a 63 y 38%, representando este último valor un porcentaje muy bajo, por cuanto para el umbral de $\geq 2+$ se han reportado en general valores de efectividad que oscilan entre 69 y 80% [14, 15].

Contaje de células somáticas (CCS)

Para las 154 muestras de leche analizadas se encontró una media para el CCS de 4.302.127,30 cel/mL (6,05 Log₁₀ CCS), valor que refleja la existencia de serios problemas de inflamación de la glándula mamaria y de baja calidad de la leche producida. Este resultado fue debido principalmente a las condiciones de las muestras de leche de los animales ordeñados en forma mecánica, para las que el valor medio del CCS fue de 7.966.137,83 cel/mL (6,70 Log₁₀ CCS), mientras que para

TABLA IV
RESULTADOS PARA PRUEBA DE MASTITIS CALIFORNIA (CMT) DE ACUERDO AL AGENTE CAUSAL DE INFECCIÓN Y TIPO DE ORDEÑO

Ordeño	Patógeno	Reacción					Total
		Negativo	Trazas	1+	2+	3+	
Manual	Mayor	0	0	5	3	13	21
	Menor	1	6	1	6	9	23
	Negativo	5	9	5	6	6	31
Mecánico	Mayor	9	6	17	10	12	54
	Menor	3	3	5	2	2	15
	Negativo	2	0	2	4	2	10

TABLA V
SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y EFECTIVIDAD DE LA PRUEBA DE CALIFORNIA PARA MASTITIS (CMT) APLICADA A LECHE DE CUARTO DE BOVINOS MESTIZOS ORDEÑADOS EN FORMA MANUAL O MECÁNICA

Parámetro	UMBRAL			
	A ¹		B ²	
	Ordeño Manual	Ordeño Mecánico	Ordeño Manual	Ordeño Mecánico
Sensibilidad (%)	84	70	70	38
Especificidad (%)	45	68	61	40
Efectividad (%)	68	63	67	38

A¹: Positivas al CMT aquellas con reacción $\geq 1+$. B²: Positivas al CMT aquellas con reacción $\geq 2+$.

las muestras de los animales ordeñados en forma manual el conteo medio fue de 730.527,57 cel/mL (5,41 Log₁₀ CCS). El análisis de varianza permitió detectar que el tipo de ordeño tiene un efecto altamente significativo ($P < 0,001$) en el conteo de células somáticas de la leche provenientes de cuarto.

Estos resultados ponen en evidencia que las máquinas de ordeño están contribuyendo a agravar la situación de elevada prevalencia de mastitis subclínica en los animales estudiados, lo que podría obedecer a diversos factores, entre ellos a un diseño de las máquinas que no les permite adaptarse a las características del pezón y la ubre, al bajo volumen de producción de leche que caracteriza a la ganadería mestiza de doble propósito del estado Zulia, o bien a que las condiciones de manejo de la máquina son seriamente inapropiadas. Neave y col. [28], afirman que es posible disminuir la tasa de nuevas infecciones corrigiendo los defectos en el diseño de las máquinas ordeñadoras, y en la operación de las mismas.

Umbral del CCS para discriminar cuartos infectados

El valor umbral para el CCS usado para clasificar cuartos como infectados o no, es muy variable entre países, y en aquellos donde se aplican programas de control de mastitis y producción de leche de calidad, son cada vez más bajos. En Norte América se utiliza como valor umbral límite 750.000 cel/mL para leche de tanque, y este es el valor que el Somali-

te, utilizado en esta investigación, aplica para identificar las muestras con mastitis subclínica. Mientras que para la evaluación a nivel de cuartos y/o animales infectados se han utilizado los valores de 500.000 cel/ml y 300.000 cel/ml. En Venezuela Scaramelli y col. [31], refieren para leche de cuarto el umbral entre 500.000 cel/ml a 532.000 cel/ml.

Con base al valor de 750.000 cel/ml se encontró que en forma global un 41,67% de los cuartos fueron negativos a la presencia de mastitis, mientras que 58,33% se encontraron infectados. Al discriminar por tipo de ordeño, para este valor límite, 24% de los cuartos de animales ordeñados a mano presentaron mastitis subclínica, mientras que para los cuartos de ordeño mecánico lo hicieron 93,75%. Todas las muestras provenientes del ordeño mecánico presentaron valores de CCS superiores a los 500.000 cel/ml, por lo que no se hicieron comparaciones con respecto a los umbrales recomendados para clasificar cuartos y/o animales con infección.

En diversos estudios [10, 18, 29, 31], se ha señalado que la prevalencia de mastitis afecta el valor umbral del CCS a utilizar para clasificar cuartos o animales con infección, afirmándose que el mismo debería seleccionarse en correspondencia con la situación particular de cada finca y tomando además en consideración otros factores que afectan los resultados del CCS. Para considerar en el país el tipo de ordeño como un factor de importancia al momento de establecer el

umbral límite de clasificación de cuartos como infectados o no según el CCS, sería necesario evaluar un mayor número de fincas y animales.

CCS y cultivo bacteriológico

Según el patógeno aislado también se encontraron diferencias altamente significativas ($P < 0,001$) entre los ordeños para el Log_{10} CCS, no así dentro de cada uno de ellos (TABLA VI). Observándose una tendencia para ambos ordeños, de un valor más elevado para las muestras con patógenos mayores, seguido por las muestras sin crecimiento y por último, las muestras con patógenos menores. Otros autores [8, 11, 31, 33], han reportado elevados contajes de células somáticas asociados a la presencia de patógenos mayores.

Los resultados obtenidos en las muestras sin crecimiento podrían deberse a que en estas se encontraban otros microorganismos causantes de mastitis, no aislables con las técnicas empleadas en este estudio para los análisis microbiológicos. Algunas investigaciones han reportado recientemente casos de mastitis causados por agentes contagiosos como *A. pyogenes* o *Prototheca* spp [16]. Sin embargo, es indudable que en el caso de los animales ordeñados en forma mecánica la elevada respuesta inflamatoria, además de la posibilidad antes mencionada, también puede estar ocasionada por la aplicación de un ordeño inapropiado o por el mal funcionamiento de la máquina.

CCS y CMT

En la TABLA VII se presentan los resultados del CCS asociados a los diferentes grupos generados con el CMT, donde puede observarse que el valor medio de CCS, para ambos ordeños, se incrementó con el resultado del CMT, al ir desde la clasificación de reacción negativa hasta 3+, esto con excepción del valor correspondiente para la reacción de trazas en las muestras de ordeño manual. El coeficiente de correlación de Spermán, obtenido para el CMT y CCS estimado con el Somalite, fue de $r = 0,42$ ($P < 0,001$) para las muestras de ordeño manual y de $r = 0,55$ ($P < 0,001$) para las muestras de ordeño mecánico, lo que demuestra una buena asociación entre los resultados obtenidos de la aplicación del CMT y CCS.

Cultivo bacteriológico, CMT y CCS

En la TABLA VIII se muestran los resultados para las tres pruebas diagnósticas aplicadas. Como puede observarse, para los animales ordeñados en forma manual, todas las muestras que presentaron un CCS superior a las 500.000 cel/mL, valor que ha sido utilizado en algunos estudios como umbral para clasificar cuartos como infectados o no [8, 31], fueron clasificadas por el CMT con una reacción de 3+, esto pone en evidencia que el CMT constituye una prueba válida para evaluar la situación de la mastitis a nivel de pezón. Es de resaltar que, para las muestras de leche sin crecimiento, o no infectadas de acuerdo al cultivo bacteriológico, y que fueron clasificadas por el CMT con reacciones de 1+, 2+ y 3+, los va-

TABLA VI
MEDIAS DEL RECUENTO DE CÉLULAS SOMÁTICAS DE ACUERDO AL AGENTE CAUSAL DE LA INFECCIÓN Y TIPO DE ORDEÑO

Categoría	N	Ordeño Manual		N	Ordeño Mecánico	
		CCS (cel/mL)	Log_{10} CCS		CCS (cel/mL)	Log_{10} CCS
Sin crecimiento	31	433.659,71	5,37	10	8.917.521,40	6,65
Patógenos Menores	23	419.369,91	5,27	15	6.009.994,13	6,61
Patógenos Mayores	21	1.005.037,19	5,60	51	8.354.928,41	6,73
Total	75	730.527,57	5,41	76	7.966.137,83	6,70

TABLA VII
CONTAJE DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS) Y PRUEBA DE CALIFORNIA PARA MASTITIS (CMT) EN LECHE DE CUARTO DE BOVINOS MESTIZOS ORDEÑADOS EN FORMA MANUAL O MECÁNICA

Reacción al CMT	N	Ordeño Manual		N	Ordeño Mecánico	
		CCS (cel/mL)	Log_{10} CCS		CCS (cel/mL)	Log_{10} CCS
Negativo	6	139.154,17	5,11	13	3.236.926,08	6,42
Trazas	15	895.327,47	5,23	8	3.936.995,00	6,48
1+	11	204.557,36	5,16	23	5.625.097,96	6,61
2+	15	243.216,53	5,27	16	8.889.241,67	6,81
3+	28	1.236.655,43	5,74	16	16.265.334,75	7,04

TABLA VIII
CONTAJE DE CÉLULAS SOMÁTICAS (cel/mL) DE ACUERDO A LA PRUEBA DE MASTITIS CALIFORNIA (CMT)
Y AGENTE CAUSAL DE INFECCIÓN

Tipo Ordeño	Patógeno	Reacción CMT				
		Negativo	Trazas	1+	2+	3+
Manual	Mayor	-	-	207.518	328.609	1.467.874
	Menor	241.827	129.381	169.281	285.718	749.312
	Negativo	118.620	132.391	208.652	241.463	1.527.799
Mecánico	Mayor	3.977.468	2.514.889	6.328.537	8.884.925	15.966.776
	Menor	2.304.227	6.307.172	4.608.681	9.705.191	10.930.967
	Negativo	1.673.808	-	2.538.627	8.492.059	23.391.054

lores medios para el CCS fueron elevados, esto representa, que aun cuando no pudo demostrarse por cultivo la presencia de infección, debieron existir condiciones que provocaron un importante aumento en el número de células somáticas. Para las muestras que se encontraron contaminadas con patógenos mayores, todas fueron clasificadas con reacciones para el CMT de 1+, 2+ y 3+, mientras que 7 muestras que se encontraban infectadas con patógenos menores alcanzaron reacciones para el CMT de negativos y trazas, la menor severidad en la respuesta inflamatoria causada por patógenos menores ha sido demostrada en diversas investigaciones [10, 18, 31, 33].

Para el caso de las muestras provenientes de los animales ordeñados en forma mecánica, también se encontró que los valores más elevados de células somáticas correspondieron a reacciones para el CMT de 2+ y 3+, pero a diferencia de lo obtenido para el ordeño manual, todas las muestras analizadas presentaron valores superiores a las 500.000 cel/mL, inclusive las que presentaron reacciones para el CMT negativas y trazas. Es posible que la grave situación de inflamación evidenciada en las muestras provenientes de los animales ordeñados en forma mecánica, afecte la diferenciación del grado de gelificación al momento de aplicar el CMT, y por tanto la interpretación del resultado.

CONCLUSIONES

La prevalencia de mastitis subclínica fue más elevada en animales ordeñados en forma mecánica donde los principales agentes causales fueron los *Staphylococcus coagulasa* positiva (40,00%), *Staphylococcus coagulasa* negativa (28,00%) y *Streptococcus* spp (17,00%), mientras que en los animales ordeñados a mano la infección fue provocada por *Staphylococcus coagulasa* negativa (40,63%), *Staphylococcus coagulasa* positiva (28,13%), y *Corynebacterium* spp (20,31%).

De acuerdo a cultivo bacteriológico la prevalencia de infección en los cuartos ordeñados a mano fue 58,67% y en los ordeñados a máquina 87,34%.

La asociación entre presencia de infección y tipo de ordeño fue altamente significativa ($P < 0,001$).

Según el CMT la prevalencia de mastitis en los cuartos ordeñados a manos fue de 72% y 57%, para los umbrales positivos 1+ y 2+, respectivamente, mientras que para los cuartos de ordeño mecánico los porcentajes fueron de 70% y 40%.

La mayor correspondencia entre cultivo y CMT se obtuvo con el umbral de 2+ en los cuartos ordeñados a mano, mientras que para los ordeñados a máquina los resultados obtenidos con el CMT fueron para ambos umbrales más bajos que el obtenido con el cultivo.

La asociación entre cultivo y el CMT, para ambos umbrales en los cuartos ordeñados a mano fue significativa ($P < 0,05$), mientras que para los ordeñados a máquina la asociación no fue significativa ($P > 0,05$) para ninguno de los umbrales.

Para las muestras ordeñadas a máquina el CCS fue de 7.966.137,83 cel/mL y para las ordeñadas a mano fue de 730.527,57 cel/mL. Demostrándose con el análisis de la varianza que el tipo de ordeño tuvo un efecto altamente significativo ($P < 0,001$) en el CCS.

El coeficiente de correlación de Spearman obtenido para el CMT y el CCS fue de $r=0,42$ ($P < 0,001$) para los cuartos ordeñados a mano y de $r=0,55$ ($P < 0,001$) para los ordeñados a máquina.

AGRADECIMIENTO

Los autores desean expresar su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES) por el financiamiento de la presente investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALONSO, F. R. Prevalencia de Mastitis Subclínica Bovina en la Cuenca del Lago de Maracaibo. I. Porcentaje de Prevalencia y Caracteres de la Infección. **1^{as} Jornadas Nacionales sobre Ganadería de Doble Propósito**. Machiques- Enero 12-16, Zulia. 23pp. 1977.
- [2] ANGSTADT, T.; SYRAWSE, N. Y; SALTER, R. S. Field applied somatic cell determination (SomaLite) in com-

- parison to Foss (ESCC). **National Mastitis Council Annual meeting Proceedings**. Albuquerque, NM. February 13-16: 36pp1997.
- [3] BATRA, T.; McALLISTER, A.. Incidence of subclinical and clinical mastitis in pureline and crossline dairy cattle. **Can. J Anim. Sci.** 63: 773 – 780. 1983.
- [4] BLANCO, M.A. Diagnóstico de la Mastitis Subclínica Bovina. **III Congreso Nacional de Control de Mastitis y Calidad de la Leche**. Leon, Junio 21-23. Mexico. 6pp. 2001.
- [5] BROWN, R.W.; MORSE, G.E.; NEWBOULD, H.F.; SLANETZ, L.W. **Microbiological procedures for the Diagnose of Bovine Mastitis**. National Mastitis Council, INC. Washington, D.C. 26pp. 1969.
- [6] BROWN, C.A.; RISCHHETTE, S.J.; SCHULTZ, L.H. Relationship of milking rate to somatic cell count. **J. Dairy Sci.** 69: 850-854. 1986.
- [7] COLE, E.J.; PAINTER, E.V.; SCHNEPPER, G.H. Detection Efficiency of Mastitis Screening Test. **J. Milk Food Technol.** 28:5-8. 1965.
- [8] DELLA, A.; ARAUJO, W.; COSTA, E.; GARCIA, M.; TÁVORA, J.; BENATTI, L. Características físico-químicas e microbiológicas do leite de vacas sem alteracoes ao exame físico da glandula mamária e com alta contagem de células somáticas. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.** 1: 42-47. 2001.
- [9] DODD, F.H.; NEAVE, F.K. Machine milking rate and mastitis. **J. Dairy Res.** 18:240-245. 1951.
- [10] DOOHHO, I.R.; MEEK, A. H.; MARTIN, S.W.; BARNUM, D. A. Somatic cell counts in bovine milk: Relationship to production and clinical episodes of mastitis. **Can. J. Comp. Med.** 48:130-135. 1984.
- [11] ERSKINE, R.; EBERHART, R.; HUTCHINSON, L.; SPENCER, S. Herd management and prevalence of mastitis in dairy herds with high and low somatic cell counts. **JAVMA.** 190 (11): 1411-1416. 1987.
- [12] FARMER, J.J. *Enterobacteriaceae*: Introduction and identification. In: **Manual of Clinical Microbiology**. Murray P, Baron E, Jorgensen J, Pfaller M, Tenover R. (Eds) 8th ed. AMS Press. Washington DC. 636-653 pp. 2003.
- [13] FEDERATION INTERNATIONALE DE LATERAI. **Bulletin Laboratory Methods for use in Mastitis. Document. 132**. Brussels, Belgium. 1-26pp. 1981.
- [14] FERNANDO, R. S.; SPAHR, S.L.; JASTER, E. H. Comparison of electrical conductivity of milk with other indirect methods for detection of subclinical mastitis. **J. Dairy Sci.** 68:449-156. 1985.
- [15] FERRARO, L.; SCARAMELLI, A.; TROYA, H. Prevalencia de la Mastitis Subclínica Bovina en Venezuela y Evaluación de la Prueba de Mastitis de California (CMT) como Prueba Diagnóstica. **Rev. Cientif FCV-LUZ IX (2)**: 81-90. 1999.
- [16] GONZÁLEZ, R.; WILSON, D. Realistic milk culture programs for herd expansion. **National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings**. Florida, February 3-2. 118-124pp. 2002.
- [17] GROOTENHUIS, G.; OLDEMBROEK, J. K.; BERGI, J. Differences in mastitis susceptibility between Holstein Friesian, Dutch Friesian and Dutch Red and White cows. Correlation between parameters for mastitis and for production. **Vet. Quart.** 1:37-46. 1979.
- [18] HARMON R.J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **J. Dairy Res.** 77:2103-2112.1994.
- [19] HIGGINS, S.; MOORE, R.K.; KENNEDY, B.W. Heritability of teat conformation traits and their relationships with somatic cell count in Holsteins. **Can. J. Anim. Sci.** 60:231-239.1980.
- [20] INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Bovine mastitis. Definition and guidelines for diagnosis. **IDF Bulletin** 211. 24pp. 1987.
- [21] INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Laboratory methods for use in mastitis work. **Comp. Contin. Educ. Pract. Vet.** F341-F346. 1987.
- [22] KITCHEN, B. Review of progues of dairy science: Bovine Mastitis. Milk Compositional Changes and Related Diagnostic Test. **J. Dairy Res.** 48(5): 167-171. 1981.
- [23] KLOSS, W.; BANNERMAN, T.. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: **Manual of Clinical Microbiology**. Murray P, Baron E, Pfaller M, Tenover F, Yolken R. (Eds.) 7th ed AMS. Washington DC. 264-282pp. 1999.
- [24] MANSILLA, A.; PEDRAZA, C.; FAJARDO, P.; AGÜERO, H. Métodos de estimación del nivel de mastitis en vacas lecheras a partir de la determinación del test de california para mastitis (CMT) de sus cuartos individuales. **Agric. Tec.** 6 (2):1-12. 2001.
- [25] MILLER, R.H.; PEARSON, R.E.; WEINLAND, B.T. Relations of mastitis with milking rate and milking time. **J. Dairy Sci.** 61(Suppl. 1): 129.1978.
- [26] NATIONAL MASTITIS COUNCIL. Manejo del Hato Lechero. **Una Revisión Comprensiva del Control de la Mastitis**. Upjohn Company. Kalamazoo. Michigan, USA. 1-15 pp. 1990.
- [27] NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection**. 3th. Ed. 1-34 pp.1990.
- [28] NEAVE, F.K.; DODD, F.H.; KINGWILL, R.G.; WESTGARTH, D.R. Control of Mastitis in the Dairy Herd by Hygiene and Management. **J. Dairy Sci.** 52(5):969-707. 1969.

- [29] PEARSON, J.; GREER, D. Relationship between somatic cell count and bacterial infections of the udder. **Vet. Rec.** 95:252-257.1974.
- [30] PLASE, D. Presente y futuro de la producción bovina en Venezuela. En: **Ganadería Mestiza de Doble Propósito.** (ed.) Stagnaro-González, C. Ediciones Astro Data, S.A. Maracaibo, Venezuela. 1-24pp. 1992.
- [31] SCARAMELLI, A.; FERRARO, L.; TROYA, H. Recuento Electrónico de Células Somáticas Aplicado a la Detección de Mastitis Subclínica Bovina en Fincas Lecheras de los Estados Aragua y Carabobo. **Rev. Científ. FCV-LUZ IX (6):** 508-518.1999.
- [32] SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D.O. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **JAVMA.** 130: 199-204. 1957.
- [33] SCHEPERS, A.; LAM, T.; SCHUKKEN, Y.; WILMINK, J.; HANEKAMP, W. Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters. **J. Dairy Sci.** 80: 1833-1840. 1997.
- [34] SLETTBKK, T.; JONTAD, A.; FARVER, T.R.; HIRD, D.W. Impact of Milking characteristics and teat morphology on somatic cell count in first lactation. Norwegian cattle. **Prev. Vet. Med..** 8: 253-267. 1990.
- [35] STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. SAS User's Guide. Cary. North Carolina, USA. 120 pp. 1986.