

Relaciones entre el recuento de células somáticas, test de mastitis California, conductividad eléctrica y el diagnóstico de mastitis subclínicas en cabras lecheras

SUAREZ, V.H.¹; MARTINEZ, G.M.¹; GIANRE, V.²; CALVINHO, L.²; RACHOSKI, A.¹; CHAVEZ, M.¹; SALATIN, A.¹; OROZCO, S.¹; SANCHEZ, V.¹; BERTONI, E.¹

RESUMEN

En el tambo caprino, las mastitis son un problema sanitario mayor que afecta tanto la productividad como la inocuidad y calidad de los productos. Debido a que el diagnóstico de las mastitis subclínicas plantea problemas para su correcto monitoreo, el objetivo planteado fue analizar las relaciones entre el estado infeccioso de las mamas, los diferentes métodos de diagnóstico como el conteo de células somáticas (CCS), test de mastitis California (CMT) y la conductividad eléctrica (CE) y sus relaciones y posibilidades de aplicación en las condiciones de los tambos caprinos del país. A partir de cabras, mayormente Saanen (71,9%) en ordeño en los periodos sept/2010-mar/2011 y jun/2011-dic/2011, se tomaron mensualmente muestras de leche individuales (n=846) de cada medio mamario. El estado infeccioso de cada muestra se determinó por cultivos bacteriológicos dividiéndolo en medios mamaros no infectados (NI), infectados con patógenos menores y patógenos mayores. El CCS se realizó por Fossomatic, y a modo de control por microscopía directa mediante técnicas de Breed clásica y método de Verde metil Y pironina (VMYP). Las pruebas de conductividad eléctrica (CE) se realizaron por dispositivo manual y el CMT fue el clásico. Además, con sólo 30 muestras se evaluó un test comercial "PortaSCC goat" para leche caprina. Las relaciones entre variables fueron analizadas por correlación lineal y regresión simple y sus diferencias por Chi cuadrado o análisis de varianza. Se calculó la sensibilidad (S) y la especificidad (E) y los valores predictivos (VP) de las pruebas. Como patógenos menores se aislaron *Staphylococcus* sp. coagulasa negativo, SCN (n=37) y como patógenos mayores sólo *Staphylococcus aureus* (n=13). La presencia de patógenos elevó los CCS (P<0,0001) y los CMT (P<0,0001), pero no la CE (0,09). Las medias de los CCS para NI, SCN y *S. aureus* fueron respectivamente de 789427±1139886, 1891432±1521385 y 5296615±3806640. La correlación hallada entre el CCS y de la CE con el estado sanitario de los medios mamaros fue respectivamente de r=0,41 (P<0,0001) y de r=0,12 (P<0,03). El CCS tuvo una correlación de r=0,86 (p<0,0001) con el VMYP, de r=0,64 (p<0,0001) con el CMT, de r=0,24 (p<0,0001) con la CE y de 0,47 (p<0,009) con el PortaSCC. El VMYP dio un conteo celular de un 20,8% inferior al Breed. Los CMT 0, T, 1, 2, y 3 se correspondieron a CCS medios respectivos de 326823, 494294, 741670, 1680557 y 3842440. La S y E respectivamente fueron de 70% y 79% para CCS, del 68% y 80% para el CMT y de solo 58% y 60% para la CE. El estudio muestra que tanto el CCS (línea de corte <1000000) como el CMT (0, T, 1) pueden ser usados para monitorear la presencia de mastitis subclínicas, teniendo en cuenta que presentan una E buena y alto VP negativo (98%) para el diagnóstico de ubres sanas y una S aceptable para detectar infecciones (especialmente patógenos mayores), siempre que se tengan en cuenta el diagnóstico bacteriológico, la recurrencia de los diagnósticos y otros factores no infecciosos ligados al aumento del CCS en las cabras.

Palabras clave: mastitis subclínica, cabra lechera, etiología, prueba diagnóstica.

¹INTA EEA Salta, CC 228, Cerrillos, 4400, Salta. ²INTA EEA Rafaela, CC 22, 2300, Rafaela, Santa Fe.
Correo electrónico: suarez.victor@inta.gob.ar

Recibido el 08 de mayo de 2013 // Aceptado el 20 de mayo de 2014 // Publicado online el 04 de junio de 2014

SUAREZ, V.H.¹; MARTINEZ, G.M.¹; GIANRE, V.²; CALVINHO, L.²; RACHOSKI, A.¹; CHAVEZ, M.¹; SALATIN, A.¹ Y OTROS

ABSTRACT

Mastitis in udders is a major health problem, affecting productivity, safety and product quality in the dairy goat. Because the diagnosis of subclinical mastitis is problematic for accurate monitoring, the objective of this study is to evaluate the relationships among the infectious status of half udder and different diagnosis methods: somatic cell count (SCC), California mastitis test (CMT) and electric conductivity (CE) and its diagnostic possibilities in the real dairy goat systems. From milked goats (Saanen, 76%) during Sept/2010-March/2011 and June/2011-Dec/2011 periods, monthly samples (n=846) of milk were taken from each half udder. Udder halves infectious status was assessed by bacteriological cultures and classified in three groups: negative culture (NI), and intrammary infections by minor pathogens and by major pathogens. Chi square, analysis of variance and correlation and regression analysis were carried out to analyse interrelations between variables. Sensitivity (S), specificity (SP) and predictive values (VP) were calculated. Coagulase-negative Staphylococcus sp SCN (n=37), were the minor pathogen and Staphylococcus aureus (n=13), was the only major pathogen isolated. Pathogen increase CCS (P<0.0001) and CMT (P<0.0001) but not CE (0.09). The average values for CCS of NI, SCN y S. aureus were respectively 789427±1139886, 1891432±1521385 y 5296615±3806640. The correlation obtained between CCS and CE was respectively r=0.41 (P<0.0001) and r=0.12 (P<0,03). The CCS had significant (p<0.0001) correlations of r=0.86 with VMYP, r=0.64 with CMT, r=0.24 with CE and 0.47 with PortaSCC. The VMYP cell counts was 20.8% lesser than Breed counts. CCS averages were for the CMT scores of 326823 (0), 494294 (traces), 741670 (1), 1680557 (2) and 3842440 (3) cells/ml. S and SP were of 70% and 79% for CCS, 68% and 80% for CMT and 58% y 60% for CE respectively. The study shows that both the CCS (cut line <1000000) and CMT (0, T, 1) can be used to monitor the presence of subclinical mastitis, considering that exhibit good high negative VP (98%) and good SP for the diagnosis of healthy udders and acceptable S for infections (specially major pathogens), provided that the bacteriological diagnosis, recurrence of diagnosis and other no infectious factors associated to elevated CCS are taken into account.

Keywords: subclinical mastitis, dairy goat, aetiology, diagnostic test.

INTRODUCCIÓN

Al igual que en lechería bovina, en el tambo de pequeños rumiantes las mastitis son un problema mayor que afectan tanto la productividad del sistema como la inocuidad y calidad de los productos (Haenlein, 2002; Leitner *et al.*, 2008). A nivel mundial (Contreras *et al.*, 2006) como a nivel nacional, las noxas del género *Staphylococcus* spp son los patógenos de más alta prevalencia responsables de infecciones intramamarias (Suárez *et al.*, 2012; Miranda *et al.*, 2001). Además, *Staphylococcus aureus* es el patógeno que mayores efectos negativos tiene en la salud y productividad de los animales como también en la de los consumidores por los riesgos que producen sus toxinas termoestables en los productos lácteos.

El diagnóstico definitivo de mastitis subclínica se realiza a partir del aislamiento de muestras de leche de patógenos, mayormente por cultivo bacteriológico. Esto suele resultar a escala de majada costoso y con el inconveniente de no tener los resultados en el momento de extraer la muestra. Para facilitar el diagnóstico de las mastitis subclínicas a nivel rebaño se desarrollaron métodos indirectos en lechería tales como el conteo de células somáticas (CCS), el test de mastitis California (CMT) o pruebas basadas en la conductividad eléctrica (CE).

Los CCS, el CMT o la CE han demostrado tener buena sensibilidad y especificidad para detectar infecciones intramamarias, es decir, mastitis subclínicas en lechería vacuna (Schalm *et al.*, 1971). También el CCS y CMT han evidenciado buena correlación y ser útiles en el diagnóstico del estado sanitario en lechería ovina (Suarez *et al.*, 2002). Sin embargo, en lechería caprina debido a diferencias fisiológicas, los valores patrones en cuanto a CCS utilizados en leche bovina no muestran ser precisos para un buen diagnóstico de mastitis (Haenlein y Hinckley, 1995). La secreción láctea de los caprinos difiere sensiblemente de aquella de las vacas, ya que es apócrina, es decir que se almacena en las células de las glándulas y al eliminarse hay partículas citoplasmáticas en esta leche que dificultan y alteran su lectura. Además, el nivel de polimorfonucleares en leche caprina sin infecciones es mucho más elevado que en la leche vacuna. Esto hace que los estándares de calidad de leche vacuna sean discriminatorios para las cabras al igual que la metodología de diagnóstico de mastitis plantea problemas en los caprinos debido a que el CCS está relacionado con otros factores como ser el número de partos, la raza, los sistemas de producción y el rinde de las cabras (Perrin *et al.*, 1996). Todo esto conlleva a que en leche caprina el CCS como metodología diagnóstica debe ser evaluado bajo diferentes condiciones y sistemas productivos (De Cremoux *et al.*, 1994).

Por otro lado, en general la lechería caprina es sostenida por pequeños y medianos productores a los cuales por recursos o escala no les es rentable o posible acceder a un análisis de CCS pero sí a otros medios diagnósticos como el CMT que aunque subjetivo es de simple y económica ejecución. Además, debido a que el CMT se basa en la reacción entre el reactivo, conteniendo lauril sulfato de sodio y púrpura de bromocresol, y el ADN de las células, tendría la capacidad de diferenciar las partículas citoplasmáticas de la leche de cabra de las células nucleadas con ADN. Por último hay algunos antecedentes que justifican la evaluación ya que han encontrado buena correlación entre el CMT y el CCS en cabras bajo otros sistemas productivos (Boscós *et al.*, 1996; Perrin *et al.*, 1996).

Debido a estos planteos que dificultan el diagnóstico de las inflamaciones mamarias subclínicas en los tambos caprinos, el presente ensayo plantea analizar las relaciones entre el estado infeccioso de las mamas, los diferentes métodos de CCS y el uso rutinario del CMT bajo las condiciones de la lechería caprina intensificada de los valles templados del NOA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar y animales en ensayo

El estudio fue realizado en el tambo caprino de la Estación Experimental Agropecuaria Salta del INTA en cabras, mayormente de raza Saanen (71,9%) y en menor proporción Toggenburg (17,4%) y Alpina (10,7%), sometidas a una rutina diaria de ordeño mecánico al tarro. Las observaciones se realizaron en 45 y 42 cabras a lo largo de dos períodos de lactancia: septiembre 2010 a marzo 2011 y junio 2011 a diciembre 2011, comprendiendo todo el ordeño hasta el secado de las cabras.

Procedimientos y muestreo

Mensualmente se tomaron en forma individual y luego de eliminar los primeros chorros de leche, muestras de leche de cada medio mamario, constituyéndose cada uno en la unidad de muestra. Para los análisis microbiológicos se tomaron asépticamente 5 cc de leche en envases estériles. En total se analizaron 929 muestras de leche.

Además, para evitar interferencias con otros problemas sanitarios, se observó el estado de las cabras en ordeño en general y de sus ubres. Al iniciar el ensayo se revisaron clínicamente las ubres, registrando la presencia de nódulos, tumefacciones y estado de los pezones.

El CMT se llevó a cabo según método de Schalm *et al.* (1971) luego de extraer los primeros chorros de leche. Según el grado de aglutinación y se clasificó en negativo sin aglutinar (0), trazas de aglutinación (0,5), moderada aglutinación (1), fuerte aglutinación (2) y gelificación completa (3).

El CCS se llevó a cabo mediante diferentes procedimientos; se utilizó el CCS por microscopía fluorescente por citometría de flujo, s/Fossomatic 5000. También el CCS se

realizó mediante recuento microscópico directo según técnica de Prescott y Breed (1910), con tinción en base a azul de metileno y la técnica de tinción con verde de metil Y pironina (VMYP) descrito por Dulin *et al.* (1982).

La prueba de conductividad eléctrica (CE) se realizó a través del dispositivo manual (Milk checker, Eisai, Japón).

Además, se probó en 30 muestras la prueba denominada comercialmente "PortaSCC goat milk test", que es un kit diagnóstico para estimar el número de células somáticas específico para leche caprina (www.portacheck.com/portascccoat.php). Esta prueba es de fácil lectura y utiliza una cartilla que vira en 45 min a diferentes graduaciones de colores: A, B, C y D que indican respectivamente un CCS de <500000, <1000000, 1500000 y >3000000.

Las muestras recolectadas para los cultivos bacteriológicos se obtuvieron luego de eliminar los 2 ó 3 primeros chorros de leche antes del ordeño de cada cabra; éstas se tomaron asépticamente recogiendo en envases estériles. La identificación bacteriana se realizó por medio de procedimientos estándar (National Mastitis Council Inc. Madison, WI., 2004) De acuerdo al resultado de cultivos bacteriológicos, se clasificaron en negativos, glándulas sanas sin desarrollo bacteriano (S/D), en glándulas con infecciones intramamarias debida a patógenos menores o banales (Pm) que alteran la calidad de la leche e infecciones debidas a patógenos mayores (PM), aquellos que además de alterar la leche son agentes etiológicos de enfermedades para los caprinos o para el ser humano. Los procedimientos para diagnosticar el virus de encefalitis-artritis caprina no fueron considerados debido a que no hay diagnósticos previos en la región de estudio.

Análisis estadísticos

Las relaciones entre variables como grado del CMT, CE, diferentes métodos para estimar CCS y el resultado de los cultivos bacteriológicos fueron analizadas usando correlación lineal (Pearson) y regresión lineal simple. Para demostrar asociaciones entre muestras con y sin patógenos con el CMT o sobre o debajo el umbral obtenido para el CCS se utilizó la prueba de Chi cuadrado y, para analizar diferencias entre variables continuas, se usó análisis de varianza. En el caso del CMT y de los resultados de los cultivos bacteriológicos, por tratarse de variables discretas a partir de ellas, para su análisis se crearon variables indicadoras o "dummy". Para los análisis indicados se utilizó el paquete estadístico InfoStat (2012).

De acuerdo a los resultados se calculó la sensibilidad (S) y la especificidad (E) y los valores predictivos (VP) de las pruebas diagnósticas (Thursfield, 1990). Para la línea de corte o umbral a utilizar como mejor se tomó en cuenta el criterio de Andrews *et al.* (1983), es decir, que los falsos negativos (FN) sean menor del 15% de los falsos positivos (FP) y que fuera máximo el número de animales correctamente clasificados (CC).

RESULTADOS

Análisis microbiológicos

Para análisis microbiológicos de las 929 muestras se analizaron 846, de las cuales 50 resultaron positivas (5,91%). De ellas, en 37 (4,37%) se aislaron *Staphylococcus coagulasa* negativos (SCN: patógenos menores) y en 13 (1,53%) sólo se aisló *Staphylococcus aureus* como patógeno mayor.

De las cabras que se aislaron SCN sólo dos repitieron aislamientos positivos en dos muestreos seguidos.

No se observaron diferencias significativas ($p < 0,40$) entre los rindes lácteos de las cabras sin aislamientos positivos y aquellas con inflamaciones intramamarias con patógenos menores y mayores cuyos rindes promedios al momento del diagnóstico fueron respectivamente de 1129,6, 1105,5 y 1000 ml de leche.

De las cabras con inflamaciones mamarias a *S. aureus* con posterioridad al diagnóstico, siete se secaron y tres presentaron mastitis clínicas (una con mastitis gangrenosa y pérdida total de la ubre).

La prevalencia de mastitis se incrementó significativamente ($X^2 48,42$; $p < 0,0001$) con el número de pariciones de las cabras; el porcentaje de muestras con aislamiento positivo, es decir con mastitis subclínicas, fue para las ca-

bras de 1ra, 2da, 3ra, 4ta y 5ta o más pariciones respectivamente de 3,9%, 2,04%, 6,81%, 7,14% y 11,68%.

No se aislaron patógenos ambientales.

Relación entre las mastitis subclínicas y los métodos diagnósticos

La tabla 1 muestra las medias y otros valores de centralización relativos al aislamiento o no de patógenos y el CCS por Fossomatic, donde los valores señalan diferencias significativas entre medios mamarios no infectados, aquellos infectados con SCN y los infectados con *S. aureus*.

La infección aumentó significativamente ($p < 0,0001$) el CCS (tabla 2), mostrando una correlación de $r = 0,44$ y un $R^2 0,19$ ($p < 0,0001$) entre el CCS y las variables regresoras (estatus infeccioso) creadas en variables indicadoras y utilizando los medios sanos como referencia.

La infección aumentó significativamente ($X^2 180,5$; $p < 0,0001$) el grado de CMT, como muestra la tabla de contingencia (tabla 3).

En la figura 1 se observa de acuerdo al grado de CMT observado, el porcentaje de medios mamarios infectados con patógenos menores y mayores.

Estatus infeccioso	n	Media aritmética	D.E.	Mínimo	Máximo	Mediana	M. geométrica
NI	796	784401 a	1139886	12000	7557000	381000	404022
SCN	37	1891432 b	1521385	80000	5355000	1619000	1181217
S.a.	13	4988923 c	3806640	990000	10718000	4431000	3161147

Tabla 1. Valores de los CCS discriminados por el estatus infeccioso de los medios mamarios. No infectado NI, infectados con SCN e infectados con *S. aureus*. S.a.

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Coef	Est.	E.E.	LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor
Constante	784401,38	42159,51	701651,4	867151,2	18,61	<0,0001
SCN	1107031,05	200040,16	714395,9	1499666,1	5,53	<0,0001
<i>S. aureus</i>	4204521,7	332581,55	3551736,7	4857306,6	12,64	<0,0001

Tabla 2. Coeficientes de regresión y estadísticos asociados al estatus infecciosos transformado en variables indicadoras (dummy) SCN y *S. aureus*.

Estatus infeccioso	CMT 0	CMT trazas	CMT 1	CMT 2	CMT 3	Total
No infectado	263	191	184	124	34	796
SCN	2	4	10	10	11	37
<i>S. aureus</i>	0	0	0	2	11	13
Total	265	195	194	136	56	846

Tabla 3. Estatus infeccioso de los medios mamarios y CMT hallados

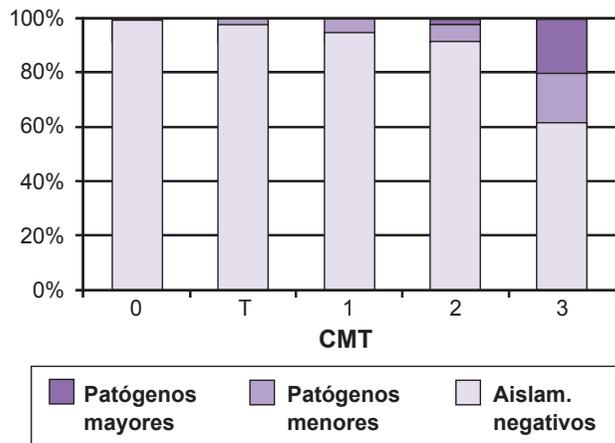


Figura 1. Proporción de muestras positivas a microorganismos patógenos recuperados de los medios mamarios según grado de CMT.

La infección mostró un aumento significativo general con respecto a la CE, pero con baja correlación del $r = 0,12$ y un $R^2 0,01$ ($p < 0,03$), siendo los valores medios de CE de 5,7, 6,1 y 6,7, respectivamente, para las muestras negativas, con SCN y *S. aureus*. Sólo se observaron diferencias ($p < 0,03$) entre las CE de los aislamientos de *S. aureus* con respecto a los de los muestreos negativos.

Los resultados en cuanto al test diagnóstico PortaSCC, mostraron que, aunque la infección aumentó significativamente ($X^2 8,8$; $p < 0,04$) los índices del test, éste no mostró una buena correlación entre las graduaciones y las mastitis halladas concentrándose el 60% de estas en el grado B que indica de 500000 a 1000000 de células somáticas.

Relación entre CCS, CMT y CE

Las medidas de resumen de los CCS de acuerdo al grado del CMT se indican en la tabla 4.

Los grados del CMT transformados en variables indicadoras tuvieron una buena correlación ($r = 0,67$) con el CCS y un $R^2 0,45$ ($p < 0,0001$), como muestra la tabla 5. En las tablas 4 y 5 respectivamente se pueden ver la relación observada en el presente ensayo entre el CCS y el CMT y los valores estimados a partir de los grados de CMT (transformados en variables indicadoras) utilizados como variables determinantes del CCS.

La conductividad eléctrica presentó una correlación de $r = 0,24$ y un $R^2 0,06$ ($p < 0,0001$) con el CCS y de $r = 0,30$ y un $R^2 0,09$ ($p < 0,0001$) con el CMT.

Los resultados del test diagnóstico PortaSCC mostraron una correlación de $r = 0,47$ ($p < 0,009$) y $der = 0,72$ ($p < 0,0001$) con el CMT.

Relación entre el CCS por Fossomatic y por microscopía ocular

Al comparar, entre las mismas muestras ($n = 48$), los CCS de leche de cabra realizados por los métodos de tinción con azul de metileno (Breed) y de verde de metil Y pironina que promediaron respectivamente 1815916 y 1419971, se observó una cifra promedio inferior del 20,8% en los conteos de la técnica de tinción de verde de metil Y pironina.

Los CCS por Fossomatic y por la tinción de verde de metil Y pironina tuvieron una correlación de $r = 86\%$ ($p < 0,0001$).

CMT	n	Media	D.E.	Valor mínimo	Valor máximo	Mediana	Media geométrica
0	301	326823	423488	12000	2932000	178000	184026
T	217	494294	527925	55000	3857000	333000	337916
1	202	741670	704501	79000	4107000	499000	530975
2	147	1680557	1425357	73000	6786000	1185000	1183722
3	59	3842440	2995175	600000	13557000	3033000	2786348

Tabla 4. Promedio y DE, valores extremos y mediana de los CCS de acuerdo al grado del CMT.

Coef	Est.	E.E.	LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor
Const.	317069,5	56569,1	206050,6	428088,4	5,6	<0,0001
CMT T	147925,8	87368,1	-23537,1	319388,8	1,69	0,0908
CMT 1	412695,3	89355,1	237332,9	588057,7	4,62	<0,0001
CMT 2	1336277,4	98865,3	1142250,7	1530304	13,52	<0,0001
CMT 3	3470613,8	138949,9	3197919,7	3743307,8	24,98	<0,0001

Tabla 5. Coeficientes de regresión y estadísticos asociados a los grados del CMT transformados en variables indicadoras (dummy) y el CCS.

Esta última tinción tuvo una buena correlación ($r=0,43$) y un $R^2 0,18$ ($p<0,0001$) con el CMT.

Sensibilidad y especificidad

La tabla 6 muestra los parámetros de validez diagnóstica para mastitis subclínicas, tomando como infecciones positivas diferentes grados de CMT. Al considerar como positivos a los CMT de grado 2 y 3 y a los patógenos menores y mayores aislados, la prueba muestra una sensibilidad (S) del 68% y una especificidad (E) del 80% con un valor predictivo positivo (VP+) del 18% y un valor predictivo negativo (VP-) del 98%. Al considerar sólo el grado 3 del CMT, la prueba muestra una S del 44% y una E del 96% con un VP+ del 39% y un VP- del 96%. Al considerar como positivos a los patógenos mayores, el CMT grado 3 aumenta la S y mantiene la E, aunque no toma en cuenta a los patógenos menores.

Al comparar la S y E del CMT en las cabras con menos de dos pariciones con la de más de dos pariciones no se hallaron diferencias.

La tabla 7 muestra los parámetros de validez diagnóstica de los CCS. Considerando los criterios que establecen que para fijar el mejor umbral para S y E, es aquel en el cual los falsos negativos deben ser menores en un 15% a los falsos positivos (Andrews *et al.*, 1983) y que el número de animales bien clasificados debe ser el máximo, el mejor valor umbral o de corte para considerar al CCS como positivo estaría entre 789000 y 1000000. Tomando los mejores valores que clasificaron bien un mayor número de cabras (71,2 y 78,1%), la pruebas con umbrales de CCS=789000 o 1000000, serían los mejores para realizar el mejor diagnóstico.

Al comparar la S y E del CCS en las cabras de no más de dos pariciones con la de más de dos pariciones no se

hallaron diferencias, aunque en las primeras el umbral de 550000 células mostro la mayor S (75%) y E (62%)

DISCUSIÓN

Los resultados muestran que sólo se aislaron aquellos patógenos más comúnmente asociados a las infecciones intramamarias en los rumiantes menores (Contreras *et al.*, 2007). Tanto los SCN como *S. aureus* fueron las noxas prevalentes al igual que en observaciones previas en ovinos (Suarez *et al.*, 2002), aunque en este caso no se aislaron microorganismos de otras especies. En Italia o en España hallaron prevalencias SCN del 80 y 96%, con la especie *Staphylococcus epidermidis* como más abundante (38%) (Moroni *et al.*, 2005; Contreras *et al.*, 2007). No se aislaron patógenos ambientales tales como *Streptococcus* spp., *Escherichia coli* o *Pseudomonas* spp., generalmente estrechamente asociados a la higiene de las camas en los corrales o a los periodos lluviosos. Probablemente, la ausencia de otros microorganismos se deba a la baja prevalencia de mastitis subclínicas (5,2%) al compararla con otros trabajos donde la prevalencia de mastitis subclínicas fue muy superior, oscilando entre el 18 y al 40,2% (Contreras *et al.*, 1996; Boscos *et al.*, 1996; Moroni *et al.*, 2005; Marogna *et al.*, 2012).

Al igual que en trabajos previos de Europa, la prevalencia de mastitis se incrementó a medida que aumentaba la edad y número de pariciones de las cabras (Boscos *et al.*, 1996; Haenlein, 2002). Moroni *et al.* (2005) hallaron un mayor número de mastitis subclínicas en las cabras de 3 a 4 pariciones al igual que en el presente trabajo.

La presencia de patógenos aumentó el CCS; los promedios de CCS de las muestras positivas a SCN (1891432 ± 1521385) y a *S. aureus* (5296615 ± 3806640) mostraron

Infección positiva	CC	S	E	VP+	VP-	(S+E)/2
CMT 2 y 3	672 (79,4%)	0,68	0,8	0,18	0,98	0,74
CMT 3	784 (92,6%)	0,44	0,96	0,39	0,96	0,7
CMT 3*	799 (94,4%)	0,85	0,95	0,2	1	0,9

Tabla 6. Umbral y parámetros de validez para el diagnóstico de mastitis subclínicas caprinas a partir del CMT. Falsos positivos (FP) y falsos negativos (FN).

*Parámetros considerando como positivo solo a los patógenos mayores

Umbral del CCS	Correctos Clasificados	S	E	VP+	VP-	(S+E)/2	FP	FN
< 550000	507 (59,9%)	0,86	0,58	0,11	0,99	0,721	332	7
<700000	574 (67,8%)	0,74	0,67	0,13	0,98	0,701	259	13
<790000	603 (71,2%)	0,72	0,71	0,14	0,98	0,716	229	14
<1000000	661 (78,1%)	0,7	0,79	0,17	0,98	0,743	170	15

Tabla 7. Umbral y parámetros de validez para el diagnóstico de mastitis subclínicas caprinas a partir del CCS. Falsos positivos (FP) y falsos negativos (FN).

cifras similares a las observadas en Francia por Lerondelle *et al.* (1992).

También las infecciones intramamarias subclínicas se correlacionaron con mayores graduaciones de CMT, donde el 84% de los *S. aureus* aislados se ubicaron en el grado 3, el cual tuvo un promedio de CCS de $5904091 \pm 3281861,28$. El CMT y el CCS mostraron una buena correlación evidenciando la posibilidad de su uso diagnóstico bajo determinadas condiciones. Las graduaciones del CMT coincidieron con resultados de trabajos en tambos caprinos de Francia y España (Lerondelle *et al.*, 1992; Contreras *et al.*, 1996).

Los CCS a través de la microscopía óptica, ya sea a través de la coloración de Breed y VMYP, tuvieron una alta correlación con el CCS. Sin embargo, al igual que resultados previos, el método de Breed sobrestimó en un 21,8% el número de células somáticas y no sería el recomendado para leche caprina (Mirek y O'Donnell, 2007). Contrariamente, al igual que los resultados del presente ensayo, el método directo a partir de la tinción de VMYP tuvo valores cercanos al CCS por Fossomatic calibrado para leche de cabra. Esta tinción es específica para ADN, diferenciando leucocitos y evitando la inclusión en el recuento de partículas citoplasmáticas (Dulin *et al.*, 1982). Debido a estas características es considerado como método de referencia oficial para leche caprina por la Administración de Estados Unidos de Alimentación y Drogas (US Food and Drug Administration; <http://www.fda.gov>) para chequear otros métodos de CCS automatizados y se considera que debe ser usado en caso de precisar resultados (Zeng *et al.*, 1999). Trabajos previos demuestran que el CCS automático por Fossomatic de leche caprina resulta un 27% menor al ser calibrado con leche de cabra y al compararlo con CCS calibrados para leche de vaca (Zeng, 1996).

Contrariamente, la CE no tuvo una buena correlación con el CCS y el CMT, al igual que esta con la presencia de patógenos, no observándose diferencias entre los valores de CE y los aislamientos de microorganismos, como si lo es como test de diagnóstico en bovinos basados en el aumento de conductividad eléctrica de la leche debido a su mayor contenido electrolítico especialmente iones de sodio y de cloro (Norger *et al.*, 2004). Tampoco obtuvieron una relación significativa la CE y el CCS durante el ordeño de cabras Alpinas y Anglo Nubian (Park, 1991).

Debido a que se contaba con un kit del test diagnóstico PortaSCC, solo se pudieron analizar un número limitado (n: 30) de muestras, impidiendo dar una opinión sobre el test y sólo referirse a los resultados.

Entre el CMT y los CCS se halló una buena relación ($r=0,64$) y diferencias entre los valores medios del CCS para cada grado de CMT (tabla 4), lo que indica que ambos métodos dan similares resultados y que los grados del CMT pueden traducirse en valores de CCS. Estos datos coinciden con la observaciones de Sung *et al.* (1999) en Taiwán, quienes hallaron correlaciones de $r=0,65$ entre CMT y CCS y las observaciones de Perrin *et al.* (1997) en Francia, donde obtuvo valores de CCS correspondiéndose con los grados de CMT.

El CCS (umbrales de 790000 y 1000000) mostró regular sensibilidad (72 y 70%), es decir que ese porcentaje es diagnosticado como verdaderos positivos, con mastitis y mediana especificidad o porcentaje de verdaderos negativos (71 y 79%). Al ver la tabla 6 se observa que el mejor umbral o línea de corte para establecer medios infectados está entre 790000 y 1000000 de CCS ya que el número de casos correctamente clasificados es mayor y el promedio de la S y E también. Otros autores que probaron líneas de corte de infecciones intramamarias de un amplio rango de CCS coinciden que el umbral de las no infectadas estaría por debajo de las 550000 y 1000000 células (De Cremoux *et al.*, 1994, Contreras *et al.*, 1996, Perrin *et al.*, 1997).

Aunque el CMT es subjetivo, sobre todo al considerar diferencias entre dos graduaciones continuas y no tanto las extremas, resultó útil para dar como negativos aquellos animales que sí lo son al igual que el CCS. Los grados 0, T y 1 al considerarlos negativos muestran un 80% de clasificaciones negativas correctas con un VP- de 98%. Por otro lado, los grados 2 y 3 (considerados positivos) muestran poca sensibilidad (68%), lo que hace considerar otros factores que pueden estar influyendo en el CMT, como el número de partos, la etapa de ordeño, el rinde, situaciones estresantes (Haenlein, 2002). Los resultados del presente ensayo muestran que el CMT así considerado tiene un 79,4% de clasificaciones correctas. La utilización del CMT para el diagnóstico de patógenos mayores, considerando como muestras negativas los grados 0, T, 1 y 2 y positivas el 3, muestra que la sensibilidad (85%) y especificidad (95%) aumentan. Sólo se debe tener en cuenta que rindes muy bajos al final de la lactancia elevan el CMT significativamente ($p<0,001$), como fue observado en este (Suarez, comunicación personal) y otros ensayos (Perrin *et al.*, 1997; Contreras *et al.*, 2007).

Estos resultados indican que tanto el CMT como el CCS, este con mayor precisión, son válidos para predecir que no hay mastitis subclínicas debido a su alto VP- (98%), es decir que un medio mamario es verdaderamente negativo (Thursfield, 1990). Pero si es algo más preciso para diagnosticar infecciones positivas a patógenos mayores, como en caso de infecciones por *S. aureus* donde los valores de CCS son elevados. Igualmente existen una serie de factores como aquellos ligados al rinde lácteo, período de lactancia, número de pariciones, plano sanitario y de estrés de las cabras que influyen significativamente en el CCS y el CMT y deben ser tenidos en cuenta (Haenlein, 2002; Suarez *et al.*, 2012) a la hora de considerar la existencia de una mastitis infecciosa y de prever un tratamiento de secado posterior.

Aunque no fue posible diferenciar las especies de *Staphylococcus coagulasa* negativos, es importante señalar que los casos clasificados como falsos negativos (FN= 32%) correspondieron a infecciones producidas por SCN, mientras que el 100% de infecciones producidas por *S. aureus* fueron clasificadas como infectados, es decir, como verdaderos positivos. Trabajos previos en tambos de España señalan que en la mayor parte de los falsos negativos se aísla *Staphylococcus caprae* que es un SCN que presenta

poca reacción inmunológica a partir de generar un limitado incremento del CCS y afectar muy poca la productividad y composición de la leche (Martínez y Peris, 1998). Estos autores concluyen para el caso de plantear tratamientos de secado, que se debe considerar un umbral de CCS que favorezca el VP+; es decir, se trataría un menor número de cabras y aquellos animales con infecciones que no serían tratados, sufrirían mayormente infecciones por *S. caprae* de menor importancia en concepto de calidad y producción de leche.

CONCLUSIONES

El CCS por Fossomatic calibrado con leche caprina, se correlacionó bien con el CCS directo por microscopía por tinción con Verde de metil Y prironina usado como método de referencia, indicando que podría utilizarse para estimar células somáticas al igual que el CCS por VMYP.

Aunque estos datos deben ser validados con nuevos ensayos bajo otros sistemas productivos, los resultados permiten concluir que a pesar de la baja prevalencia de mastitis subclínicas, el CCS por Fossomatic tuvo una buena correlación con el CMT y una S y E buena para diagnosticar ubres sanas y aceptable para diagnóstico de ubres infectadas (>1000000) y elaborar estrategias de control, siempre que se tengan en cuenta otros factores ligados al aumento del CCS en las cabras.

También estos resultados parciales arrojan que los CMT de 0 a 1 se pueden tomar como indicadores de ubres sanas, que el CMT 3 puede ser considerado como indicador de mastitis y que un CMT 2 debe ser tratado como un cuadro dudoso, que de repetirse se debe indicar un cultivo bacteriano. Esto siempre considerando diagnósticos repetidos en el tiempo en un animal y otros factores como etapa de lactancia, fundamentalmente cerca del secado, número de partos, rindes bajos, etc.

Al compararlo con los resultados de CCS por Fossomatic, el CMT usado en las condiciones normales de un tambo es un método seguro para chequear el estatus sanitario del rebaño, aunque siempre se debería considerar el diagnóstico por cultivo de microorganismos. Los presentes resultados muestran que el CMT compensa sus limitaciones frente al CCS por su sencillez de uso, por ser económico y por la obtención rápida de resultados, especialmente bajo estos tipos de sistemas manejados por pequeños o medianos productores que no tienen otra posibilidad de diagnóstico.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la desinteresada colaboración de José Alfaro en las tareas de toma de muestras y de campo.

BIBLIOGRAFÍA

ANDREWS, R.J.; KITCHEN, B.J.; KWEE, W.S.; DUNCALFE, F. 1983. Relationship between individual cow somatic cell counts

and the mastitis infection status of udder. *Austr. J. Dairy Technol.* 38,71-74.

BOSCOS, C.; STEFANAKIS, A.; ALEXOPOULOS, C.; SAMARTZI, F. 1996. Prevalence of subclinical mastitis and influence of breed, parity, stage of lactation and mammary bacteriological status on Coulter Counter Counts and California Mastitis Test in the milk of Saanen and autochthonous Greek goats. *Small Ruminant Research*, 21, 139-147.

CONTRERAS, A.; SIERRA, D.; CORRALES, J.C.; SANCHEZ, A.; MARCO, J. 1996. Physiological threshold of somatic cell count and California mastitis test for diagnosis of caprine subclinical mastitis. *Small Rumin. Res.* 21, 259-264.

CONTRERAS, A., SIERRA, D., SANCHEZ A., CORRALES, J.C., MARCO, J.C., PAAPE, M.J., GONZALO, C. 2007. Mastitis in small ruminants. *Small Ruminant Research* 68, 145-153

DE CREMOUX, R. ; POUTREL, B. ; PILLET, R. ; PENIN, G. ; DUCCELLIER, M.; HEUCHEL, V., 1994. Utilisation des numérations cellulaires pour le diagnostic des infections mammaires d'origine bactérienne chez la chèvre. (Use of somatic cell counts for diagnosing mammary infections of bacterial origin in goats). *International Symposium on Somatic Cells and Milk of Small Ruminants*, 25-27 September 1994, Bella, Italy, pp. 22-24.

DULIN, A.M.; PAAPE, M.J.; WEINLAND, B.T. 1982. Differentiation and enumeration of somatic cells in goat milk. *J. Food Prot.* 45, 435-439.

HAENLEIN, G.G.W.; HINCKLEY, L.S., 1995. Goat milk somatic cell count situation in USA. *Int. J. Anim. Sci.* 10, 305-310.

HAENLEIN, G.G.W., 2002. Relationship of somatic cell counts in goat milk to mastitis and productivity. *Small Ruminant Research* 45, 163-178

HOGAN, J.S.; GONZÁLEZ, R.N.; HARMON, R.J.; NICKERSON, S.C.; OLIVER, S.P.; PANKEY, J.W.; SMITH, K.L. 1999. *Laboratory Handbook on Bovine Mastitis*. National Mastitis Council Inc. Madison, WI. pp. 222.

LEITNER, G.; SILANIKOVE, N.; MERIN, U. 2008. Estimate of milk and curd yield loss of sheep and goats with intramammary infection and its relation to somatic cell count. *Small Ruminant Research* 74, 221-225.

LERONDELLE, C.; RICHARD, D. ; ISSARTIAL, J. 1992. Factors affecting somatic cell counts in goat milk. *Small Rumin. Res.* 8, 129-139.

MAROGNA, G, PILO, C., VIDILI, A., TOLA, S., SCHIANCHI, G., LEORI, S.G. 2012. Comparison of clinical findings, microbiological results, and farming parameters in goat herds affected by recurrent infectious mastitis. *Small Rumin Res.* 102, 74-83

MARTÍNEZ, B.; PERIS, C. 1998. Utilización del RCS del control lechero dentro de un programa de control de mastitis subclínicas en el ganado caprino. *Producción Ovina y Caprina*, XXIII, 369-373

MIRANDA A.O.; SUAREZ V.H.; CALVINHO L.; BUSETTI M.R.; CANAVESIO V.; BEDOTTI, D.O. 2001. Epidemiología de las mastitis subclínicas en ovejas lecheras en la región pampeana. *Vet. Arg.*, XVIII, N° 176: 411-422

MIREK, E.; O'DONNELL, S. 2007. A Comparison of Pyronin Y-Methyl Green Stain and Methylene Blue Stain for Somatic Cell Count in Sheep Milk. University of Rhode Island, <http://digitalcommons.uri.edu/srhonorsprog/49>.

MORONI, P.; PISONI, G.; RUFFO, G.; BOETTCHER, P.J. 2005. Risk factors for intramammary infections and relationship with somatic-cell counts in Italian dairy goats. *Prev. Vet. Med.* 69, 163-173

NORBERG, E.; HOGVEEN, H.; KORSGAARD, I.R.; FRIGGENS, N.C.; SLOTH KHMN, D.; LØVENDAHL, P. 2004. Electrical

- Conductivity of Milk: Ability to Predict Mastitis Status. *J. Dairy Sci.* 87, 1099–1107.
- PARK, Y.W., 1991. Interrelationships between somatic cell counts, electrical conductivity, bacteria counts, percent fat and protein in goat milk. *Small Rumin. Res.* 5, 367–375.
- PERRIN, G.G. ; MALLEREAU, M.P. ; LENFANT, D. ; BAUDRY, C. 1997. Relationships between California mastitis test (CMT) and somatic cell counts in dairy goats. *Small Ruminant Research* 26, 167-170.
- PRESCOTT, S.C.; BREED, R.S. 1910. The determination of the number of the body cells in milk by a direct method. *J. Infect. Dis.* 7, 632-640.
- SCHALM, O.W.; CARROL, E.J.; JAM, N.C. 1971. Bovine Mastitis. *Physical and Chemical Tests for Detection of Mastitis.* Lea y Febiger, Philadelphia, pp. 128-157.
- SUAREZ, V.H. 2012. Mastitis ovinas y caprinas. Diagnóstico y control. En: Programa de Ámbito Nacional Leche. Producción técnica-científica de Proyecto Cartera 2006-2009 / 2010-2012. (Eds, Taverna M., Comeron, E.A., Suarez, V.H.) Producciones INTA, Argentina, 793-794 p.
- SUAREZ V.H.; Buseti M.R.; MIRANDA A.O.; CALVINHO L; BEDOTTI D.O.; CANAVESIO V. 2002. Effects of infectious status and parity on somatic cell count and California mastitis test in Pampinta dairy ewes. *J Vet. Med. B*, 49, 230-234
- SUNG, Y.Y.; WU, T.I.; WANG, P.H. 1999. Evaluation of milk quality of Alpine, Nubian, Saanen and Toggenburg breeds in Taiwan. *Small Rumin. Res.* 33, 17–23.
- THURSFIELD, M. 1990. *Epidemiología Veterinaria (Veterinary Epidemiology).* Editorial Acribia S.A., Zaragoza., 339 pp.
- ZENG, S.S. 1996. Comparison of goat milk standards with cow milk standards for analyses of somatic cell count, fat and protein in goat milk. *Small Rumin. Res.* 21, 221–225.
- ZENG, S.S.; ESCOBAR, E.N.; HART, S.P.; HINCKLEY, L.; BAULTHAUS, M.; ROBINSON, G.T.; JAHNKE, G., 1999. Comparative study of the effects of testing laboratory, computing method, storage and shipment on somatic cell counts in goat milk. *Small Rumin. Res.* 31, 103–107.