

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Título del Trabajo Final: *Correlación entre Recuento de Células Somáticas, California Mastitis Test e Identificación del Patógeno Actuante.*

Autor: ESTANISLAO DELFINO

DNI: 36.479.825

Director: Mació Mauro

Aprobado y corregido de acuerdo con las sugerencias de la Comisión Evaluadora:

Bonino Facundo	_____
Navarro Osvaldo	_____
Mació Mauro	_____

Fecha de Presentación: ____/____/____.

Secretaria Académica

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMIA Y VETERINARIA

Trabajo Final presentado para optar al Grado de Médico Veterinario

Modalidad: Práctica Profesional

Correlación entre Recuento de Células Somáticas,
California Mastitis Test e
Identificación del Patógeno Actuante

ESTANISLAO DELFINO

DNI: 36.479.825

Director: Mació Mauro

Río Cuarto – Córdoba

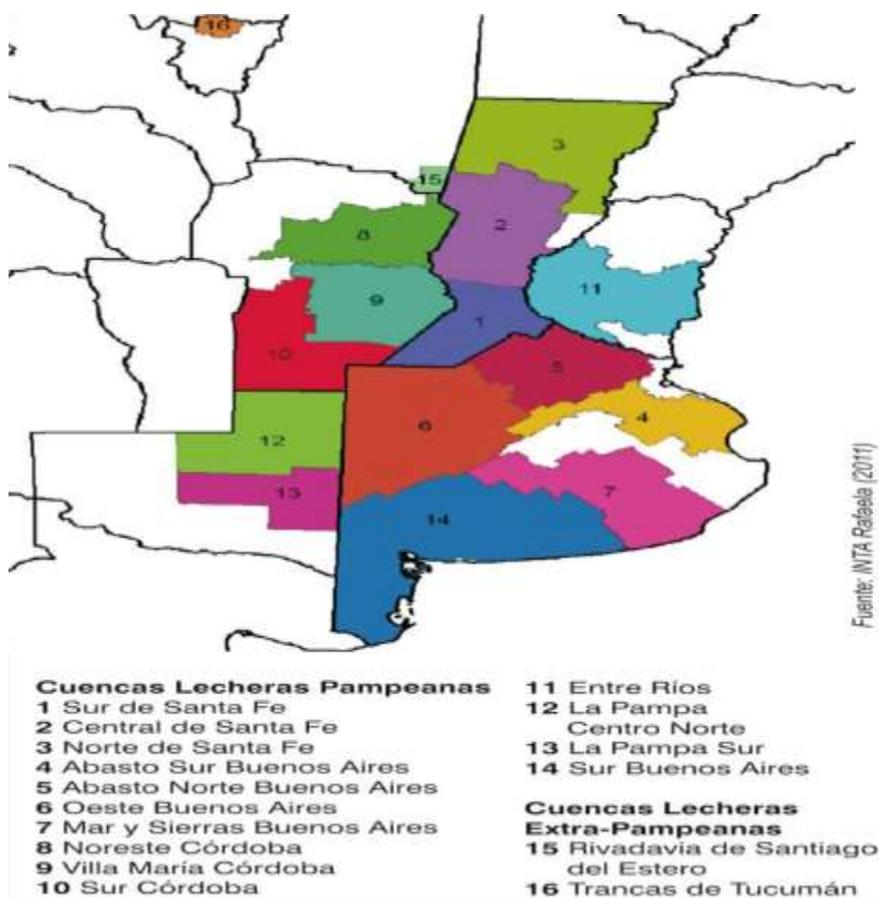
DICIEMBRE/2016

INTRODUCCIÓN:

El sector lácteo bovino es uno de los complejos agroalimentarios más importantes y dinámicos de la Argentina ocupando un lugar destacado a nivel mundial en cuanto a la producción de leche y el volumen exportado. Las proyecciones a mediano plazo coinciden en que la demanda global de lácteos será mayor que el crecimiento de la oferta siendo este desfase abastecido por un reducido grupo de países entre los cuales se encuentra la Argentina (Callaci, C. R. 2012).

Nuestro país se ubica como segundo productor de leche cruda de América Latina y decimo primero en el orden mundial. La producción de leche se desarrolla en una amplia región. La evolución reciente de algunos indicadores de escala, refleja una dinámica diferente en los distintos territorios. Las principales zonas productoras corresponden a la región pampeana con distinta participación de las provincias y las cuencas lecheras (Sanchez, C. y col 2012).

La producción láctea se concentra en las provincias de: Buenos Aires, Santa Fe, Córdoba, Entre Ríos, La Pampa y Tucumán (SAGPyA, 2003).



Fuente: INTA Rafaela (2011)

Existiendo cuencas menores en otras provincias como Chaco y Salta (*Buelink et al., 1996*). Se considera que desde 1988 hasta 2002 el número de tambos se redujo de 30.500 a 13.000, mientras las explotaciones crecieron en tamaño desde un promedio de 66 vacas/tambo hasta 161 vacas/tambo en el mismo período (*Gutman et al., 2003*). Si bien en sus inicios la lechería argentina se sustentó en sistemas pastoriles, a partir de la década del 80 y sobretodo en la del 90, se fueron adoptando sistemas semipastoriles y otros más intensivos (*Gutman et al., 2003*).

La participación relativa de las principales provincias (Santa Fe, Córdoba, Buenos Aires y La Pampa) ha ido variando en función del tiempo. Si bien todas han mostrado crecimiento en los últimos años, la provincia de Buenos Aires ha perdido participación relativa. Esto puede explicarse, principalmente, por la mayor tasa de crecimiento que ha presentado la provincia de Santa Fe. Por otro lado, Córdoba mantiene su posición al igual que Entre Ríos, La Pampa y otras provincias (*SAGPyA, 2003*).

Durante las últimas décadas se han producido grandes transformaciones en el sector lechero. A partir de la década del 90 se observó un significativo aumento de la producción y la productividad y posteriormente se centraron los esfuerzos en mejorar la calidad higiénica de la leche y también la sanitaria a través de un mayor control de la mastitis (*Calvinho, L. F. & Tirante, L. 2005*).

Esta patología produce grandes pérdidas económicas representadas por la disminución de la producción, alteración de la calidad de la leche, los costos por tratamiento y los descartes. También representan un riesgo potencial para la salud humana. En un momento dado, más del 50% de las vacas en producción de un rodeo pueden sufrir de mastitis, bien sea en forma clínica, subclínica o crónica. Las más frecuentes son las mastitis subclínicas (más del 40%) y las pérdidas económicas son atribuibles principalmente a esta forma de mastitis, donde se estima que se pierde en cada rodeo más del 12% de la producción lechera por año. La mastitis es reconocida como uno de los problemas más costosos de salud en los rodeos lecheros (*Cerón-Muñoz, M. F. et al. 2007*).

Las pérdidas económicas producidas devienen tanto de la valoración de la frecuencia, la severidad y la duración de la enfermedad como del nivel productivo del establecimiento (*Petrovski, K. R. et al. 2006*).

Antecedentes de Argentina:

En Argentina no existían estadísticas actualizadas acerca de las pérdidas económicas que causa la mastitis bovina, estimaciones realizadas durante la década del 70 indicaban mermas anuales por menor producción de U\$115 millones (*González et al., 1977*), mientras que en la década

del 80 se estimaban pérdidas por disminución de la producción de más de \$220 millones por año (*Asociación Argentina de Lucha Contra Mastitis, 1983*).

El primer reporte realizado en Argentina de pérdidas directas y gastos de control y prevención diarios relacionados a la mastitis bovina, basado en una muestra aleatoria de productores lecheros de la cuenca de Villa María; Córdoba, obtuvo como resultado en promedio un costo de 16% de los ingresos brutos.

El costo total ocasionado por esta enfermedad experimenta importantes cambios entre establecimientos, así como la importancia relativa de los costos directos y las erogaciones derivadas de su control y prevención. La mastitis subclínica se destaca como el componente más importante del costo total. La cuantificación del costo total contribuirían a una mejor percepción del impacto de la enfermedad y ciertamente podrían motivar a sectores públicos y privados a reforzar las acciones de control y prevención de la mastitis entre los productores lecheros (*Vissio, C. et al. 2015*).

Mastitis:

Definición:

Mastitis: (del griego mastos = glándula mamaria y del sufijo itis = inflamación) se refiere a la inflamación de la glándula mamaria sea cual sea su causa. Se caracteriza por modificaciones patológicas del tejido glandular y alteraciones físicas, químicas y casi siempre bacteriológicas de la leche. Entre las anomalías más importantes de esta última cabe mencionar cambio de color y presencia de coágulos y de gran número de leucocitos. En el estado actual del conocimiento se define a la mastitis como una enfermedad caracterizada por la presencia de una cantidad significativamente aumentada de leucocitos y va precedida por cambios de la leche como resultado directo de la lesión (*Gieseck, 1975*). En los casos de mastitis clínica, se producen pérdidas por baja producción del animal enfermo y por la duración de la eliminación del medicamento; frecuentemente hay un perjuicio duradero en el rendimiento de la vaca; costos de medicamentos, servicios veterinarios y aumento en los costos de la mano de obra (*Schlenstedt y Zschock, 1997*). En los casos de mastitis subclínica, se produce una considerable reducción en la producción diaria de leche; cambios importantes en su composición (cuajado del queso); se perjudica su valor higiénico, ya que los daños causados por esta son de 20 a 50 veces más frecuente que la mastitis clínica. (*Bohm y Heeschen, 1995*).

Clasificación:

1-De acuerdo al grado de la inflamación y a las lesiones locales e implicaciones sistémicas en la vaca:

Mastitis subclínica:

La mastitis subclínica se caracteriza por la presencia de un microorganismo en combinación con un conteo elevado de células somáticas en leche, esta puede desarrollar fácilmente una inflamación y no tener tratamiento. Este tipo de mastitis no presenta cambios visibles en la leche o ubre. Apenas se percibe una reducción en el rendimiento de la leche, siendo alterada su composición por la presencia de componentes inflamatorios y bacterias (*Gallegos, A. y Moncada, J. N. 2011*). Esta presentación de la enfermedad es la más persistente en el ganado lechero; ocurre frecuentemente, y puede conducir a grandes pérdidas económicas no solo por la reducción de la producción, también por los elevados conteos de células somáticas presentes en los tanques de leche (*Ariznabarreta et al., 2002*). En la práctica, los casos de mastitis subclínica con frecuencia no son detectados rápidamente, o pueden incluso no ser reconocidas por el ordeñador (*Wellenberg G. J. et al., 2002*). Para identificar estos casos de mastitis es necesario las técnicas de laboratorio como la medición del conteo de células somáticas y el cultivo bacteriológico (*Sixtos, E. S. 2011*).

Mastitis clínica:

La mastitis clínica es definida como una anomalía en la glándula mamaria de la vaca o la leche, que puede ser fácilmente observada (*Tollersrud T. et al. 2000*). Se caracteriza por la tumefacción o dolor en la ubre, enrojecimiento de la misma, la leche puede presentar una apariencia anormal y, en algunos casos, hay aumento de la temperatura rectal, letargo, anorexia e incluso la muerte. Además, las bacterias están presentes en la leche, lo que reduce el rendimiento y la calidad considerablemente (*Heringstad, B. et al., 2000*). En los casos en que la inflamación de la ubre es acompañada de signos clínicos es diagnosticada entonces como mastitis clínica (*Djabri, B. et al., 2002*).

Con el sólo cambio macroscópico de la leche ya se considera mastitis clínica aunque no hayan signos en la ubre (*Saran, A. y Chaffer, M., 2000*).

La mastitis clínica puede presentarse de forma aguda y se caracteriza por su aparición súbita. En la forma crónica, se presenta una infección de larga duración, con leche de apariencia anormal y/o cambios al realizar la palpación del tejido de la ubre (*Schrick, F. N. et al., 2001*).

Clasificación de la Mastitis clínica según Cano, J. P. 2006:

- Mastitis con glándula improductiva o glándula ciega (MI): La infección ya tiene en ocasiones semanas, la glándula se ve pequeña, esta flácida y fría, ya no sale leche sino exudados, las constantes fisiológicas están normales ya que la fibrina se encargó de aislar esta glándula y

provoca una hipoxia y necrosis del parénquima con abscesos y exudados como el purulento. Con algunos agentes etiológicos inclusive el parénquima se puede desprender.

- **Mastitis Crónica (MC):** La infección tiene más de 5 días, toda la leche sale con tolondrones, la ubre está severamente inflamada, endurecida y caliente, la vaca se encuentra con fiebre, taquicardia, polipnea, atonía ruminal, anorexia, etc. , se pierde el 50% de producción.
- **Mastitis Moderadamente Aguda (MMA):** La infección tiene más de 24 horas, la vaca presenta sus constantes fisiológicas normales, a la inspección la ubre se ve normal, a la palpación el parénquima es normal, pero la leche sale acompañada con un poco de grumos o tolondrones que pueden ser detectados al realizar la prueba del tazón oscuro obligatoria antes de ordeñar a cada vaca. Disminuye aproximadamente el 30 % de la producción láctea.
- **Mastitis Severamente Aguda (MSA):** La infección tiene más de 72 hrs. Las Constantes fisiológicas están normales. La leche sale con más cantidad de tolondrones, a la inspección ya se aprecia cierta inflamación en la glándula, en relación con las otras tres y a la palpación la glándula esta dura y caliente, se pierde el 40% de producción. (Cano, J. P. 2006).

2-De acuerdo al origen:

Mastitis contagiosa: *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium bovis*, *Mycoplasma spp.*

Mastitis originada en la piel de los pezones: *Staphylococcus no aureus*, *S. hyicus*, *S. chromogenes* y otros, *Streptococcus no agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. bovis*, *S. uberis*, entre otros.

Mastitis ambiental: *Escherichia coli*, *Enterobacter spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella spp*, *Serratia spp*, *Citrobacter freundii*.

Mastitis iatrogénica: Asociada al uso inadecuado de cánulas intramamarias con la etiología de Mohos o Levaduras de los géneros: *Candida*, *Cryptococcus* y *Trichosporum* (Varela, B. 2002).

Microorganismos causantes de Mastitis:

Tienen la particularidad de penetrar la ubre a través del canal de los pezones. La penetración puede ocurrir por multiplicación, movimiento mecánico, propulsión durante el ordeño o por una combinación de factores.

Aproximadamente del 90 al 95% de los casos son provocados por cuatro microorganismos. Ellos son: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus dysgalactiae* (Jaime L. y Pinzón G. 1989).

Se han realizado estudios para determinar la prevalencia de los microorganismos causantes de mastitis a lo largo de las tres últimas décadas. En estos estudios se han utilizado ya sea leche de cuartos mamarios, leche compuesta proveniente de los cuatro cuartos de cada vaca, como también leche de tanque de frío (Calviño, L. F. y col. 2005). En la provincia de Córdoba en un relevamiento realizado en 1977 sobre 30 establecimientos lecheros, 18 con ordeño mecánico y 12 con ordeño manual, de los Deptos. Río Cuarto, Tercero Arriba, Juárez Celman y Gral. San Martín, se seleccionaron 300 muestras de cuartos mamarios con grados 2 y 3 de California Mastitis Test (CMT). A partir de estas muestras, el patógeno aislado en mayor frecuencia fue *S. aureus* (43,27%), seguido por distintas especies del género *Streptococcus*. Entre estas especies, la más frecuentemente aislada fue *Streptococcus uberis* (19,2%), seguida por *S. agalactiae* (13,5%) y *S. dysgalactiae* (5,3%) (González et al., 1980).

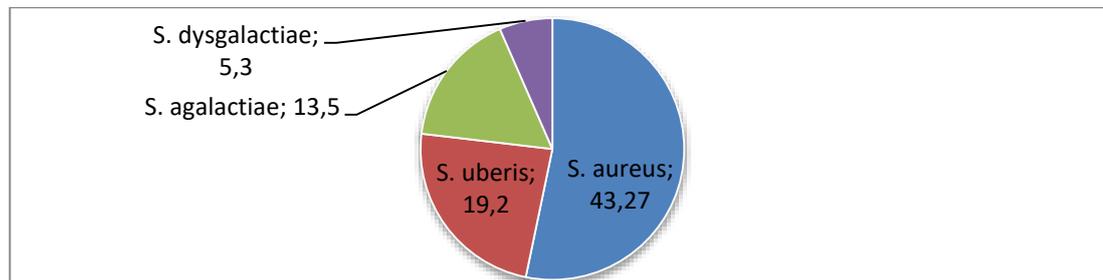


Gráfico 1: distribución bacteriológica

Posteriormente, en un estudio llevado a cabo sobre 17 establecimientos lecheros de la zona centro sur de la provincia, se recolectaron muestras de leche del 10 al 20% de las vacas en ordeño, aplicando una técnica de muestreo sistemático, sobre 541 muestras procesadas, el 65,2% arrojó resultados negativos, mientras que los patógenos más frecuentemente aislados correspondieron a distintas especies de *Staphylococcus coagulasa negativos* (12,2%), especies de *estreptococos* (8,13%) y *S. aureus* (5,9%) (Giraudó et al., 1995).

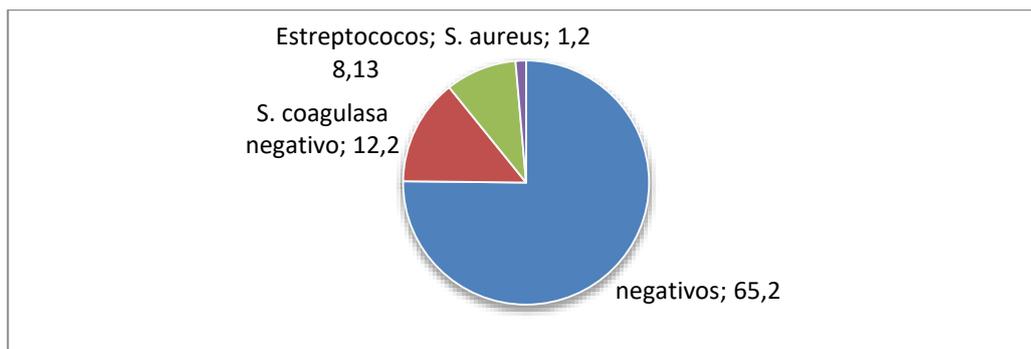


Gráfico 2: distribución bacteriológica

Luego otra investigación realizada en la misma provincia, mostrò a través de un procedimiento de muestreos y análisis bacteriológicos que 83,1% de las muestras que dieron más de 200.000 células en el Recuento de Células Somáticas (RCS) resultaron positivas, además los patógenos aliados de mayor frecuencia eran *estafilococos coagulasa negativos* (52,1%), seguido por *Staphylococcus aureus* (21,3%), *Corynebacterium spp.* (5,2%), *Streptococcus agalactiae* (4,4%) y *Streptococcus dysgalactiae* (4,4%).

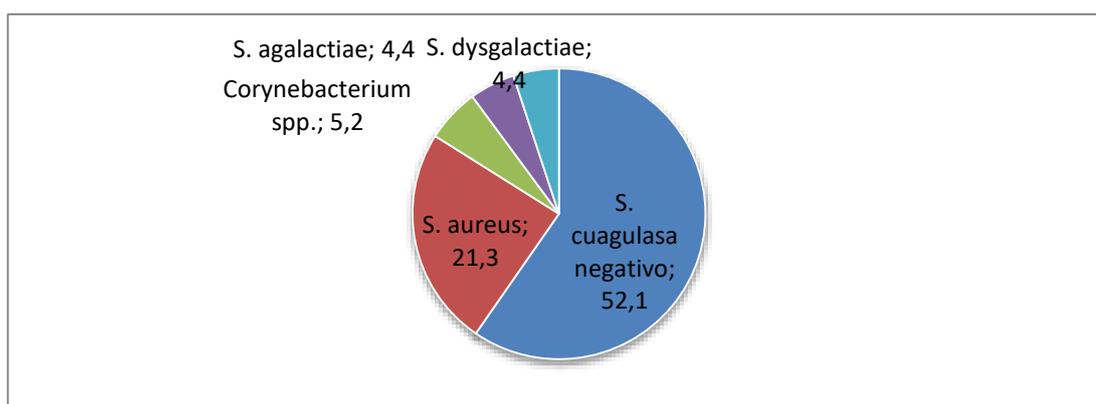


Gráfico 3: distribución bacteriológica

Este estudio demuestra que entre los principales patógenos aislados, las etiologías contagiosas causan la mayoría de las infecciones subclínicas de vacas lecheras en Córdoba, Argentina. Por otra parte, los *estafilococos coagulasa negativos* eran los más relevantes del grupo de patógenos causantes de mastitis subclínica leve (Dieser, S. A. et al, 2014).

Características de algunos de ellos:

Staphylococcus aureus: está permanentemente en el medio ambiente de la vaca y su depósito principal en las vacas adultas lo constituyen las ubres y tetas afectadas. Este organismo no progresa en la piel de las tetas sanas, pero rápidamente forma colonias en los canales de los pezones, especialmente si existe lesión en o cerca de las puntas de las mismas, lo cual facilita su penetración y la invasión de los tejidos de la ubre, ocasionando la formación de un tejido

cicatrizal. Este tejido impide que las drogas y medicamentos penetren en los lugares infectados, haciendo que el tratamiento en la lactancia sea a menudo ineficaz.

Streptococcus agalactiae: se encuentra principalmente en ubres infectadas. En rebaños infectados, el organismo puede aislarse del aire, en el lugar donde duermen los animales, en el equipo de ordeño, las manos del ordeñador y otros objetos, pero su presencia en esos lugares es el resultado de la contaminación con leche infectada; al no haber infección en la ubre, el organismo desaparecerá de todos estos lugares secundarios, normalmente dentro de las tres semanas. Este es el único organismo común de la mastitis, susceptible de ser erradicado de todo un rebaño lechero.

Streptococcus dysgalactiae: la fuente principal son las ubres infectadas, amígdalas y lesiones en la piel. En los rebaños que se encuentran libres de infección de *Streptococcus dysgalactiae*, los organismos que provocan nuevos casos de mastitis se originan probablemente en la boca de la vaca; muy raramente se consiguen en la piel de tetas sanas.

Streptococcus uberis: se encuentran con mayor frecuencia en la piel de la ubre de las tetas, que dentro de éstas. Es la causa más importante de infecciones antes de la primera parición y durante el período de secado de la vaca.

Otros patógenos:

Coliformes: la incidencia de la infección es, generalmente poca, aunque pueden ocurrir brotes cuando existen condiciones que aumentan la exposición a las mismas. Los coliformes provienen del estiércol. Las vacas más viejas, produciendo leche libre de leucocitos, son susceptibles a ser atacadas por este patógeno.

Pseudomonas: generalmente aparece una infección persistente que puede estar caracterizada por exacerbaciones agudas o subagudas intermitentes. La exposición extensa o tratamientos intramamarios se ha registrado como una causa de la infección. Las pseudomonas a menudo emanan de fuentes de aguas contaminadas, de la tierra o de las máquinas ordeñadoras que no han sido limpiadas debidamente.

Corynebacterium: este patógeno produce una mastitis característica en vacas secas, se observa también en vacas en lactancia. Produce una inflamación que se caracteriza por la formación de un exudado purulento de olor fétido (Jaime L. y Pinzón G. 1989).

Métodos de detección de la mastitis bovina:

1-Observación y palpación de la ubre

La infección puede provocar inflamación de uno, varios cuartos o de toda la glándula, aumento de la temperatura en el área afectada, así como enrojecimiento de la zona y dolor, estos eventos

provocan que el sistema inmune del animal actúe tratando de aliviar el problema, además de lograr la mayoría de las veces mantener la infección únicamente en el área afectada sin alterar otros órganos o sistemas del animal. Cuando se presentan todos o alguno de los síntomas enumerados se puede interpretar como un caso de mastitis clínica, donde además se encuentran cambios importantes en la leche que produce el tejido afectado, estos cambios pueden consistir en alteración del color, aparición de grumos, coágulos sanguinolentos, coágulos con pus, o una leche más acuosa, entre otros (*Pérez, C. G. et al., 2005*).

2-Pruebas físicas

Sólo son útiles cuando la mastitis ya está avanzada y no detectan mastitis subclínica. Dentro de estas se encuentran las siguientes: la prueba de la escudilla de ordeño, prueba del paño negro y la taza probadora (*Pérez, C. G. et al., 2005*).

Prueba de la escudilla de ordeño

Para leches anormales, se recoge la leche sobre un tejido negro extendido encima de la escudilla, los grumos se hacen así muy visibles (*Charles, A. 1984*).

Prueba del paño negro

Se realiza durante la preparación de la vaca para el ordeño. Consiste en la detección de grumos en la leche (tolondrón) haciendo pasar los primeros chorros a través de una malla negra o bien utilizando una cubetilla especialmente diseñada para eso. Es recomendable realizar este procedimiento en todos los ordeños ya que además de detectar leche anormal, se eliminan bacterias que normalmente se encuentran en mayor cantidad en estos primeros chorros y además se estimula la “bajada” de la leche (*Pérez, D. M. 1986*).

Taza probadora

Los primeros chorros de leche de cada ordeño sobre un recipiente (strip cup) de fondo oscuro. Los coágulos, escamas, hilos, materia fibrosa, secreciones acuosas, o color anormal indican que la leche no es normal y que hay problemas probables. En la mastitis crónica la leche no tiene apariencia visible anormal en todos los ordeños (*Carrión, G. M. 2001*).

3-Pruebas químicas

Entre éstas se encuentran: la conductividad eléctrica de la leche, papel indicador de mastitis y la prueba de Whiteside. Respecto a la conductividad eléctrica, el procedimiento químico es muy variable y hasta cierto punto subjetivo por lo que no es recomendable como prueba única (*Pérez, C. G. et al., 2005*).

Conductividad eléctrica de la leche

La Prueba de Conductividad Eléctrica se ha utilizado como un indicador de la mastitis durante la última década, se basa en el aumento de conductividad eléctrica de la leche debido a su mayor contenido electrolítico especialmente iones de sodio y de cloro y se ha desarrollado como un método para monitorear el estado de la mastitis en la vaca (*Medina, C. M. y Montaldo, V. H. 2003*).

Esta técnica es importante porque mide la lesión, como es el caso del recuento celular. Sin embargo, sus limitaciones probablemente restringen su uso a vacas de producción elevada que se mantienen en rebaños pequeños, o en laboratorios con auto analizadores (*Radostits, O. M. et al 2002*).

Papel indicador de mastitis

Este método, consiste en un papel sobre el que se hace caer directamente del pezón algunas gotas de leche, se consideran sospechosas las leches que dan una coloración correspondiente a un pH igual o superior a 7. La prueba descubre el 50% de las leches infectadas (*Charles, A. 1984*).

Prueba de Whiteside

La mezcla de leche con una solución de NaOH al 4% ocasiona que la leche se gelifique formando grumos que son visibles. Los grumos serán más grandes conforme la leche contenga mayor número de células somáticas. Para hacer más visible la reacción es conveniente usar una placa de acrílico negra que puede tener dibujada 4 cuadros de 3cm x 3cm, uno por cada cuarto (*Ávila, T. S. 1984*).

4-Pruebas biológicas

Dentro de éstas se encuentran: la prueba de California mastitis test, prueba de Catalasa, prueba de Wisconsin, prueba de CAMP y el monitoreo de células somáticas, así como el diagnóstico bacteriológico por los métodos de aislamiento, cultivo, tinción, bioquímica e identificación (*Pérez, C. G. et al., 2005*).

Prueba de California Mastitis Test (CMT)

La Prueba de California Mastitis Test (CMT) ha sido empleada durante décadas y sigue siendo la prueba más utilizada a nivel de campo para el diagnóstico de mastitis en el ganado bovino lechero (*Medina, C. M. y Montaldo, V. H. 2003*).

La prueba consiste en una paleta plástica con cuatro pocillos de los cuales corresponderán cada uno para cada cuarto de la ubre, realizándose el agregado de un detergente a la leche, el

alquilaurilsulfonato de sodio, causando la liberación del ADN de los leucocitos presentes en la ubre y este se convierte en combinación con agentes proteicos de la leche en una gelatina. A mayor presencia de células se libera una mayor concentración de ADN, por lo tanto mayor será la formación de la gelatina, traduciéndose en nuestra lectura e interpretación del resultado como el grado más elevado de inflamación (Medina, C. M. y Montaldo, V. H. 2003).



Interpretación de los resultados, prueba CMT.

Fuente: Bedolla C. C. et al. 2007.

Prueba de Wisconsin para Mastitis (WMT)

La Prueba de Wisconsin para Mastitis (WMT), fue diseñada para el uso en el laboratorio, y es utilizada para estimar el contenido de células somáticas de muestras de leche fresca mezclada o leche de tanques de enfriamiento, así como para muestreo de vacas individuales. Se utiliza una solución similar a la que se emplea con la prueba de California (CMT), pero en contraste con esta última, los resultados se miden cuantitativamente dependiendo de la viscosidad, no cualitativamente o de estimarla a ojo de buen cubero como en la CMT (Fernández, J. A. 1997).

Pruebas bacteriológicas

Los cultivos en laboratorio son necesarios para identificar los organismos específicos que se encuentran comprendidos en un caso clínico de mastitis y para distinguir los animales sanos de aquellos que presentan un caso subclínico. La fidelidad de los resultados de laboratorio depende de los cuidados sanitarios que se tengan durante la toma de muestras y su manipulación posterior (Pérez, C. G. et al., 2005).

Monitoreo de células somáticas:

Microscopia directa:

El recuento microscópico directo de células somáticas de la leche denominado también, método óptico, si bien es de referencia, actualmente es de poca utilidad cuando se trata de un

gran número de muestras y se debe trabajar con una metodología más rápida. Sin embargo, aún mantiene su utilidad para los trabajos de investigación (Saran, A. y Chaffer, M. 2000). El método tradicional de recuento de células somáticas es el “recuento directo” por microscopio utilizando un agrandamiento de 100x. Es un ensayo cuantitativo de laboratorio por el cual se examinan bajo el microscopio utilizando frotis teñidos de leche problema y se cuenta el número de células somáticas (Carrión, G. M. 2001).

Método Somaticell

El somaticell puede ser utilizado para analizar la leche proveniente de una o muchas vacas, se puede utilizar para el diagnóstico de la mastitis subclínica, o para realizar el programa de manejo de todo el rodeo durante un mes. En el caso de las muestras individuales de leche, se determina la probabilidad de la presencia de mastitis, también se analiza en la leche de tanque, la calidad de leche del rodeo, con ello se puede estimar el porcentaje de animales con infección de la glándula mamaria. Se utiliza un kit con un procedimiento similar al de la prueba de Wisconsin (Bedolla, C. et al. 2007).

Métodos de conteo electrónico celular

Los métodos electrónicos tienen en la actualidad una aplicación universal, sobre todo en laboratorios de control lechero o dedicados al diagnóstico o investigación de la mastitis, utilizándose aparatos de recuentos celulares como el Bactoscan, Fossomatic (Foss Electric, Dinamarca) y el CounterCoulter (Coulter, Inglaterra) (Saran, A. y Chaffer, M. 2000; Bedolla, C.). Las pruebas de **Recuento de Células Somáticas** (RCS) y prueba **California Mastitis Test** (CMT) son herramientas prácticas que se pueden aprovechar para realizar el diagnóstico de la mastitis en los rodeos lecheros. La combinación de estas dos técnicas permite realizar un diagnóstico más objetivo a la hora de tomar decisiones en nuestros sistemas de producción lecheros: el CMT permite identificar las vacas con mastitis subclínicas y el RCS permite corroborar el grado de alteración de la glándula reflejado en la concentración de células somáticas halladas.

El CMT no proporciona un resultado numérico, sino más bien una indicación de si el recuento es elevado o bajo, por lo que todo resultado por encima de una reacción vestigial se considera sospechoso (Blowey y Edmonson, 1995; Bedolla, 2004).

La Prueba de California es un método de diagnóstico que posee una sensibilidad del 97% y una especificidad del 93%. Sus ventajas principales son: Es una técnica muy sensible y se puede utilizar tanto en una muestra de cuartos, como una muestra del tanque enfriador. En una muestra de tanque, los resultados de grado 2 y 3, indican un alto porcentaje de vacas infectadas. La prueba no presenta alteraciones con la presencia de material extraño (pelo u otro material). Es simple y no requiere de equipo costoso. La paleta es fácil de limpiar después de cada uso.

A pesar de sus ventajas, la técnica presenta los siguientes inconvenientes: Los resultados pueden ser interpretados de forma variable, entre los individuos que realicen la prueba, por lo que resulta necesario uniformizar el criterio de casos positivos y su categorización en grados. Pueden presentarse falsos positivos en leche de animales con menos de diez días de paridos o en vacas próximas a secarse. La mastitis clínica aguda da resultados negativos, debido a la destrucción de los leucocitos por las toxinas provenientes de los microorganismos presentes (Medina, C. M. y Montaldo, V. H. 2003; Smith, B. P. 1990).

El RCS aumenta en la leche, en proporción directa con la severidad del cuadro infeccioso, de tal manera que su cuantificación constituye uno de los parámetros de mayor interés para determinar el estado sanitario de la ubre y la calidad del producto que se produce. Los valores informados en casos de ausencia de infección mamaria oscilan entre 200.000 y 300.000 cel/ml, mientras que recuentos superiores a 800.000 cel/ml suelen estar asociados con infecciones persistentes, la mayoría de los cuartos lecheros normales poseen menos de 100.000 cel/ml (Cerón-Muñoz, M. F. y col. 2007).

Este grupo de elementos están formados por células epiteliales de descamación natural del interior de la ubre, consecuencia de la renovación periódica del tejido (2%) y glóbulos blancos (98%) que proceden de la sangre y linfa y que acuden a la glándula mamaria en casos fisiológicos, como consecuencia del proceso de migración leucocitaria hacia los epitelios, o en casos de infección por el aumento de la migración (respuesta inmune celular inespecífica); es así como el recuento celular aumenta en la leche, en proporción directa con la severidad del cuadro infeccioso, de tal manera que su cuantificación constituye uno de los parámetros de mayor interés para determinar el estado sanitario de la ubre y la calidad de la leche que se produce (Cerón-Muñoz, M. F. y col. 2007).

Los niveles elevados de células somáticas de manera anormal pueden ser resultado de diversos factores:

1. La vaca está infectada con microorganismos causantes de la mastitis (Blowey, R. y Edmondson, P. 1995).
2. La ubre ha sufrido alguna lesión.
3. Frecuencia de ordeño (Blowey y Edmondson, 1995).
4. Estrés.
5. Variación fisiológica.
6. Cantidad de cuartos o vacas afectadas (Saran y Chaffer, 2000)

Interpretación de resultados para la prueba de CMT:

Score	Significado	Descripción De La Reacción	Interpretación (Rcs / MI)
N	Negativo	La mezcla permanece en estado líquido y homogéneo.	0-200.000
T	Trazas	Hay algo de engrosamiento. La reacción es reversible y la viscosidad observada por primera vez tiende a desaparecer.	150.000-500.000
1	Ligeramente Positivo	La mezcla espesa, pero no hay formación de gel en el medio de la paleta y la viscosidad observada tiende a persistir. La mezcla cae poco a poco.	400.000-1.500.000
2	Positivo	Gel se formará en el centro de la paleta durante el movimiento giratorio. El gel se acumula en la parte inferior de la paleta cuando el movimiento giratorio se interrumpe. Cuando se vierte la mezcla la masa gelatinosa cae y puede dejar un poco de líquido en el pocillo.	800.000-5.000.000
3	Muy Positivo	Gel se formará en el centro de la paleta y se pega en el fondo del pocillo, pero no a un lado. Cuando se vierte la mezcla, se cae sin dejar líquido detrás.	>5.000.000

Fuente: *Servet Talavera 2012.*

Las diferentes compañías recolectoras de leche han implementado castigos para aquellos establecimientos que no logren los niveles promedio permitidos de células somáticas en la leche, motivando al dueño para que logre producir una leche de calidad, para lo cual se aplican programas de sanidad y salud animal, así como formatos para mejorar el manejo de los animales (*García,2003*).

HIPÓTESIS:

La técnica de CMT es un indicador confiable del recuento de células somáticas.

Los patógenos aislados en la zona de estudio corresponden con los más frecuentes encontrados en Argentina.

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la técnica de CMT como herramienta de diagnóstico de mastitis subclínica. Identificar los agentes patógenos de mastitis presentes durante un semestre.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Evaluar la concordancia entre los resultados de CMT con los RCS a nivel cuartos.
- Identificar los agentes causales de las mastitis subclínicas.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Área de estudio y rodeo:

Cabe destacar que en este estudio se tuvo gran participación por parte del tambero, alumnos de la granja y personal del laboratorio.

Se trabajó con un rodeo de 27 vacas raza holando, de las cuales 21 eran las que estaban en ordeño. Se realiza la rutina de un ordeño por día, llevado a cabo a las 16 horas, a través de una maquina al vacío con tres bajadas y fosa al medio, con modelo espina de pescado de ambos lados de la fosa.

Se cuenta con el antecedente de aislamiento de *S. aureus* en el rodeo.

La producción se destinara para consumo en la granja y para la elaboración de subproductos que se comercializan, tales como queso, dulce de leche, yogur, etc.

Toma de muestra de leche:

Se realizó una vez por mes, acordando con el director el día para viajar a la granja, se preparan todos los materiales, una vez en el tambo se colocan botas, ropa de trabajo y guantes de látex descartables.

Se espera que ingresen las vacas a la espina de pescado, antes de comenzar el ordeño se observan las condiciones de las ubres para luego realizar el CMT y la toma de muestra que consiste en:

Pasos a seguir para la realización de la Prueba de California para Mastitis:

1. Se lavan y secan los pezones.
2. Se desechan los primeros chorros durante el despunte.
3. Se ordeñan uno o dos chorros de leche de cada cuarto en cada una de las placas de la paleta.
4. Se inclina la paleta de modo que se desecha la mayor parte de esta leche. Para nivelar la cantidad de leche en los cuatro pocillos.
5. Se añade a la leche un volumen igual de reactivo.
6. Se mezcla el reactivo y se examina en cuanto a la presencia de una reacción de gelificación.
7. Interpretación del resultado (según *Philpot, 2001*).
8. Antes de continuar con la vaca siguiente se debe lavar la placa.

En este punto se debe realizar un entrenamiento de 2 horas con unas 25 muestras utilizando una guía impresa. Los resultados se anotan en una planilla donde se especifica la caravana de

cada vaca, la fecha de procesamiento y que cuarto correspondía a cada resultado (TD: trasero derecho, TI: trasero izquierdo, DD: delantero derecho, DI: delantero izquierdo). Esta planilla también consta de otras columnas como RCS, cultivo y observaciones de cultivo, que son utilizadas luego del análisis en el laboratorio.

Vaca	Fecha	Cuarto	Grado de CMT	RCS	Cultivo	observacion cultivo
761	10-12-15	TD	0			
761	10-12-15	TI	3			
761	10-12-15	DD	0			
761	10-12-15	DI	3			

Pasos a seguir para la toma de muestra para cultivo bacteriológico:

1. Desinfección de la punta del pezón con algodón y alcohol.
2. Extracción de leche manual en tubos estériles.
3. Conserva de tubos en un ambiente entre 4-6°C hasta procesamiento en el laboratorio dentro de las primeras 24hs.

Se tomaron muestras de la vaca y muestras individuales de cada cuartos, las cuales fueron rotuladas en cada tubo con el número de vaca y las iniciales de cada cuarto (TD, TI, DD, DI).

Procesamiento de las muestras en el laboratorio:

Examen bacteriológico:

A partir de las muestras de leche se procede al examen bacteriológico, el cual consta del aislamiento e identificación por pruebas bioquímicas. El conocimiento de los agentes etiológicos predominantes en un rodeo lechero adquiere dimensión desde el punto de vista práctico, ya que permitirá delinear para cada establecimiento las medidas de control más adecuadas. Además, se convertirá en una herramienta eficaz para el monitoreo y seguimiento de la efectividad de las medidas de control aplicadas (*Calvinho, L.F. 1998*).

Las muestras se agitaron para homogeneizarlas y liberar las posibles bacterias atrapadas en los glóbulos grasos de la leche. Alícuotas extraídas con un ansa en anillo esterilizada y trabajando en el cono de esterilidad se sembraron en placas de agar sangre de carnero (ASC). Las cuales fueron incubadas a 37°C durante 48 horas en condiciones de aerobiosis; se observaron y, en caso de no haber crecimiento, se incubaron hasta las 72 horas. Los cultivos fueron examinados para determinar la morfología macroscópica de las colonias desarrolladas y su número relativo. A partir de las colonias representativas se realizó un frotis fijo teñido con tinción de Gram para guiar la identificación.

Recuento de células somáticas:

Es la medición más ampliamente utilizada para supervisar el estado inflamatorio de las glándulas mamarias, y puede ser realizada en la leche de: 1. cuartos individuales; 2. vacas individuales; 3. el rodeo completo; 4. un grupo de rodeos (*Philpot, 2001; Bedolla, 2004*).

Este recuento se realizó según el método de medición directa: Recuento Microscópico Directo (RMD) creado por Prescott y Breed, que es el primer procedimiento microscópico para el examen de frotis en leche, con el fin de contabilizar las bacterias y leucocitos presentes en ella (*Gordon y col., 1980*). Este es un método laborioso y no muy preciso, pero es el método de referencia con el que se comparan todos los nuevos procedimientos de recuento de células somáticas (*Bremel, R. 1980*). *Leidl, W. et al. (1961)* indican que existe una serie de factores que hacen variar los valores de los RMD entre los que se encuentran la experiencia del operador con el método, la calidad del frotis y la cantidad de frotis que cuenta. Por estos factores los recuentos pueden tener hasta un 45% de error con un promedio de 15% para leche con menos de 300.000 cél/ml.

Cada muestra fue agitada para homogenizar las partículas, se extrajo 0,01 ml con una micropipeta, se la esparció en 1 cm² sobre un porta objetos. Luego se lo seca en estufa o con un secador y se lo tiñe con azul de metileno durante 20-30 min, seguido del lavado suave con agua y se deja secar por 24 horas para luego poder realizar el recuento en el microscopio con el objetivo de inmersión (100X).

Con el microscopio se observa una cierta cantidad de campos, mientras más se observen más representativo será el resultado, tratando de recorrer uniformemente el frotis. Contando los leucocitos que se encuentran en cada campo, luego se divide la cantidad de leucocitos sobre la cantidad de campos contados y se multiplica por el factor de microscopio (FM). Finalmente se multiplica ese resultado por 0.01 y dando como resultado la cantidad de leucocitos/ml de leche.

$$\text{Leucocitos/ml} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de leucocitos contabilizados}}{\text{N}^{\circ} \text{ de campos observados}} \times FM \times 0.01$$

$$FM = \frac{10.000^*}{3,1416 \times r^2}$$

*Conversión de superficie a volumen

El Factor de Microscopio se calcula con un micrómetro ocular con divisiones en 0.1 y 0.01 mm. Se coloca en la platina de la misma forma que un portaobjetos. Se mide el diámetro del campo ocular y se calcula el radio.

Análisis estadístico:

Se midieron dos variables, una cuantitativa (RCS) y otra ordinal (CMT). Se transformó el valor de RCS en una variable ordinal utilizando los puntos de corte que se describen en la bibliografía. Se realizó un análisis de concordancia, para ello se calculó el índice de concordancia y el índice Kappa de Cohen utilizando el software epidat 3.1. (*Xunta de Galicia, 2006*).

El término **concordancia** se deriva de la expresión latina *concordare*, cuyo significado hace referencia a que hay correspondencia o conformidad de una cosa con otra. Su importancia en el área de la salud reside en que existen diversas maneras de valorar los fenómenos de la naturaleza y por lo tanto aparecen distintas aproximaciones o métodos diagnósticos usados para medir los mismos fenómenos o enfermedades. Por lo tanto, la concordancia adquiere importancia cuando se desea conocer si con un método o instrumento nuevo, diferente al habitual, se obtienen resultados equivalentes de tal manera que eventualmente uno y otro puedan ser remplazados o intercambiados ya sea porque uno de ellos es más sencillo, menos costoso y por lo tanto más costo-efectivo, o porque uno de ellos resulta más seguro para el paciente, entre otras múltiples razones. En términos generales, la concordancia es el grado en que dos o más observadores, métodos, técnicas u observaciones están de acuerdo sobre el mismo fenómeno observado.

Así, la concordancia no evalúa la validez o la certeza sobre una u otra observación con relación a un estándar de referencia dado, sino cuán acordes están entre sí observaciones sobre el mismo fenómeno. En estos casos se considera que los estudios evalúan la consistencia entre los métodos o instrumentos. En los estudios en los que uno de los métodos o instrumentos nuevos se comparan frente al método que constituye el patrón de referencia o Gold estándar, se evalúa la conformidad del método respecto al patrón de referencia que también se denomina validez o desempeño operativo de una prueba diagnóstica.

La concordancia entre los métodos y sus mediciones puede alterarse por los siguientes elementos o fuentes de error: 1) la variabilidad de los observadores, 2) la variabilidad dada por el instrumento de medida y 3) la variabilidad debida a medir en momentos diferentes en el tiempo. En un estudio de concordancia se ejerce un efecto artificial de controlar la variabilidad en el fenómeno observado mientras que se determina el grado de acuerdo entre dos o más observadores o instrumentos sobre ese fenómeno. Ahora bien, es posible que dos o más observaciones u observadores estén de acuerdo, sólo por efecto del azar. Bajo esta premisa, se han diseñado modelos estadísticos que estiman el grado de acuerdo existente entre dos o más observadores u observaciones, después de retirar el efecto del azar de dicha observación (*Cortés, et al. 2010*).

Una herramienta estadística es el **Índice de Kappa** desarrollado por *Cohen J. (1968)* para ajustar el efecto del azar en la proporción de la concordancia observada. La estimación por el índice de Kappa sigue la ecuación:

$$Kappa = \frac{Po - Pe}{1 - Pe}$$

Donde P_o es la proporción de concordancia observada, P_e es la proporción de concordancia esperada por azar y $1 - P_e$, representa el acuerdo o concordancia máxima posible no debida al azar.

Entonces, el numerador del coeficiente Kappa expresa la proporción del acuerdo observado menos el esperado, en tanto que el denominador es la diferencia entre un total acuerdo y la proporción esperada por azar. En conclusión, el Kappa corrige el acuerdo sólo por azar, en tanto es la proporción del acuerdo observado que excede la proporción por azar. Si este valor es igual a 1, estaríamos frente a una situación en que la concordancia es perfecta (100% de acuerdo o total acuerdo) y por tanto la proporción por azar es cero; cuando el valor es 0, hay total desacuerdo y entonces la proporción esperada por azar se hace igual a la proporción observada.

De otro lado, *Landis J. R. y Koch G. G. (1977)* propusieron una interpretación cualitativa del índice de Kappa utilizada clásicamente en la que la fuerza de concordancia se califica como:

- Pobre o débil para valores menores a 0,40.
- Moderada, para valores de entre 0,41 y 0,60.
- Buena, entre 0,61 y 0,80
- Muy buena para valores superiores hasta 1.

Es importante resaltar que estos rangos son amplios y arbitrarios.

RESULTADOS Y DISCUSION:

Se realizaron 5 muestreos entre 10-12-15 y 05-08-16. Se tomaron 103 muestras a nivel vaca y 72 muestras a nivel cuarto. A todas las muestras se les realizó RCS y cultivo en laboratorio, a las muestras a nivel cuarto se les realizó CMT en la fosa.

Salud de las ubres del tambo por muestreo:

El % de mastitis subclínica detectado por RCS a nivel vaca en cada muestreo fue:

1º muestra 52,63%, 2º muestra 52,94%, 3º muestras 50%, 4º muestra 56,52%, 5º muestra 70%.

Bacteriología:

Los resultados de los aislamientos se muestran en el cuadro 1.

Cultivo	Absoluto	Porcentaje
NEG	16	15,53
SCN	70	67,96
SA	8	7,77
SCN SA	6	5,83
SA Corine	1	0,97
SCN Corine	1	0,97
BG-	1	0,97
Total	103	100

Cuadro 1: Resultados de aislamientos bacteriológicos.

Referencias: NEG: negativo

SCN: *estafilococos coagulasa negativo*

SA: *estafilococos aureus*

Corine: *corinebacterium*

BG-: *bacilos gram negativos*

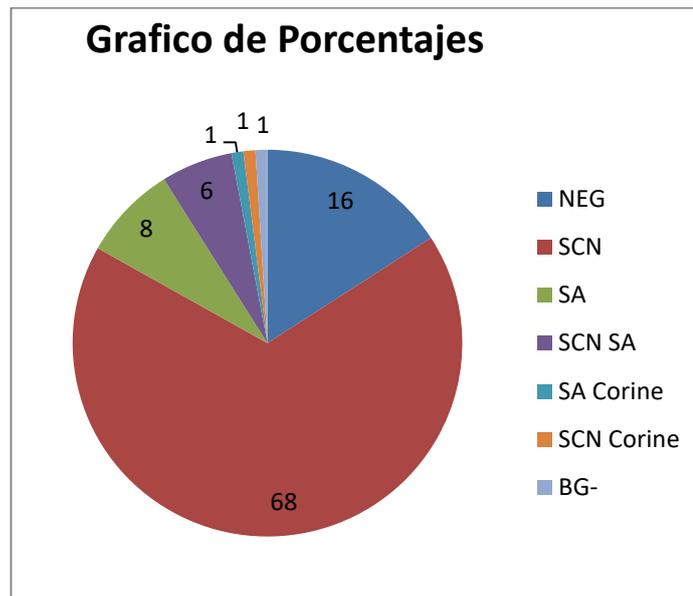


Gráfico 4: distribución de aislamiento bacteriológico

El cuadro 2 muestra los resultados por muestreo

Cuadro 2

	muestreo				
	1	2	3	4	5
Fecha	10-12-15	19-02-16	04-04-16	20-05-16	05-08-16
cantidad de vacas muestreadas	19	17	24	23	20
% vacas con cultivo positivo	84.21	94.12	83.33	73.91	90
% vacas S. aureus	36.84	5.88	12.5	4.35	15
% vacas con SCN	63.16	88.24	66.63	69.56	90
% vacas con corinebacter	0	0	0	4.34	5

Para analizar los resultados de cultivo bacteriológico se coloca un punto de corte en 250.000 CS. Se dividen los resultados en dos grupos, uno que contenga todas las vacas que dieron menos (clasificadas como sanas según este indicador) y otro grupo que contenga todas las vacas sobre ese punto de corte (clasificadas como mastitis subclínica).

Grupo de menos de 250.000 CS:

80% de vacas mostró algún crecimiento bacteriano. La distribución de los agentes aislados se muestra en el cuadro siguiente.

	Absoluto	%
NEG	9	20
SCN	33	73
SA	1	2
BG-	1	2
SCN SA	1	2
Total	45	100

Cuadro 3

Grupo de más de 250.000 CS:

88% de vacas mostró algún crecimiento bacteriano. . La distribución de los agentes aislados se muestra en el cuadro siguiente.

	Absoluto	%
NEG	7	12
SCN	37	64
SA	7	12
SCN SA	5	9

SA Corine	1	2
SCN Corine	1	2
total	58	100

Cuadro 4

DISCUSIÓN:

Del total de muestras cultivadas a nivel vaca un 84% resultó positivo con la distribución que aparece en el cuadro 2, donde podemos decir que este es un porcentaje elevado pero dentro de los valores esperados, comparándolo con un trabajo antes citado *Dieser, S. A. et al, 2014*, que se realizó en esta misma provincia en el cual se obtuvo 83,1% de muestras positivas que dieron en el RCS más de 200.000 células, y una distribución bacteriológica similar en cuanto a las posiciones de las especies. Otros trabajos citados como *Giraudó et al., 1995* y *González et al., 1980*, concuerdan parcialmente con los resultados encontrados en este trabajo, aunque es importante resaltar que el diseño y las características del tambo donde se realizaron las observaciones tienen algunas diferencias con estos estudios previos.

Es importante destacar el alto porcentaje de *Staphylococcus cuagulasae* negativos (SCN). Según la bibliografía se ha convertido en el agente de la mastitis bovina más común aislada en muchos países, por lo que podría describirse como el patógeno emergente de la mastitis. Los SCN no son tan patógenos como los otros principales patógenos causantes de mastitis y la infección sobre todo sigue siendo subclínica. Sin embargo, SCN puede causar infecciones persistentes, que dan lugar a aumento del recuento de células somáticas y disminución de la calidad de la leche. Dañar los tejidos de la ubre y conllevar a un descenso de la producción de leche. Actualmente *Staphylococcus simulans* y *Staphylococcus chromogenes* son las especies predominantes.

Concordancia entre CMT y RCS:

Se transformó los RCS observados en las muestras tomadas a nivel cuarto según la referencia bibliográfica en una escala de 0 a 4.

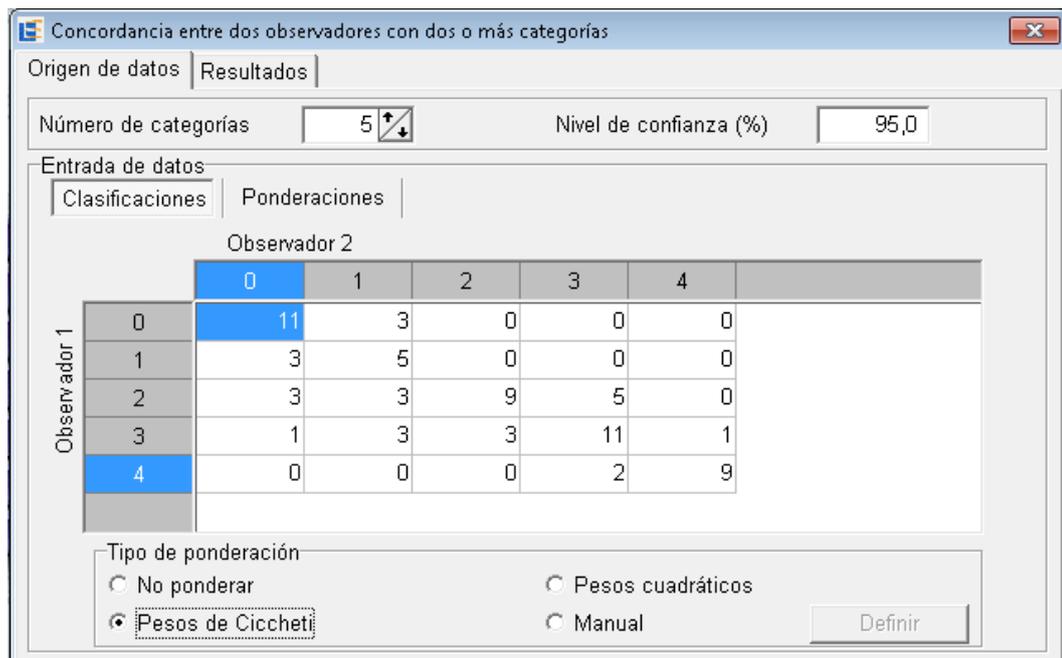
Referencias:

Bibliografía	Practica	Cel. somáticas
NEGATIVO	0	0-200.000

TRAZA	1	150.000-500.000
1	2	400.000-1.500.000
2	3	800.000-5.000.000
3	4	Más de 5.000.000

Se realizó el análisis de concordancia asumiendo el CMT y el RCS como dos observadores independientes de una misma variable.

Se cargaron los datos en una tabla de análisis de concordancia en Epidat



Se escogió la ponderación de Pesos de Cicchetti por ser la que más castiga la diferencia entre los observadores. Se considera que errar por más de una categoría es costoso en términos de impacto en la decisión que se toma para el tratamiento del caso.

Resultados:

Nivel de confianza: 95,0%

Número de categorías: 5

Tipo de ponderación: Pesos de Cicchetti

Acuerdo observado: 0,8785

Acuerdo esperado: 0,6109

Estimación puntual del Índice de Kappa: 0,6877

Estimación por intervalos de confianza (IC) (95,0%): 0,5760-0,7993

La obtención de una simple estimación puntual del valor de Kappa no proporciona ninguna precisión de dicha estimación. Desde el punto de vista de la estadística inferencial es esencial conocer la variabilidad de los estimadores para emplear ese conocimiento en la construcción

de intervalos de confianza y en la formulación de contrastes de hipótesis para poder obtener conclusiones a nivel poblacional.

- Prueba de significación:

Valor p: < 0,0001

Un índice kappa de cohen de 0.69 se corresponde con una concordancia “buena” según proponen Landis J. R. y Koch G. G. La mayor parte de los valores del IC están comprendidos en la misma interpretación del índice.

CONCLUSION:

Los resultados muestran que el CMT como herramienta puede ser muy útil para estimar el RCS en la fosa de manera inmediata. Es muy práctico y el operador no tiene que tener mucha experiencia.

En cuanto al aislamiento bacteriológico podemos decir que los patógenos aislados en la zona de estudio corresponden con los más frecuentes encontrados en Argentina.

Sugerencias al productor:

Sabiendo que en este caso la producción no se entrega a ninguna empresa o acopiador sino que se procesa en el mismo establecimiento para la elaboración de quesos, se podría realizar un antibiograma en los cultivos de SCN viendo que antibiótico funcionaria con más eficiencia a la hora de tratar las vacas que tengan mastitis subclínica, teniendo en cuenta por los datos anteriores que el SCN es el que participa en mayor porcentaje en las infecciones de la glándula mamaria, realizar una buena práctica en la rutina de ordeño lavando bien los pezones, secando, colocando sellador, mantener en pie la vaca luego del ordeño, buen estado de los corrales de espera, utilizar el CMT entre determinados periodos para tener algún tipo de control identificando vacas que tengan mastitis subclínica destinando la leche de estas hacia otra línea de producción y realizar el tratamiento adecuado.

PRESUPUESTACIÓN Y FINANCIAMIENTO:

- Viajes. En el marco de la Pasantía Socio-Productiva en un Proyecto Social (Protocolo de vinculación académica FAV-UNRC y As. Civil Granja Siquem) y en vehículo particular a cargo del director.
- Insumos y equipos necesarios. A cargo del grupo de sanidad en rumiantes. Plan de trabajo incluido en proyecto de PSC convocatoria 2015.

BIBLIOGRAFÍA:

- Ariznabarreta, A., Gonzalo, C., San Primitivo, F. (2002). Microbiological Quality and Somatic Cell Count of Ewe Milk with Special Reference to Staphylococci. *J. DairySci.* 85:1370-1375. Consultado el 28/07/16 en http://www.produccionanimal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_leche/78mastitis.pdf
- Asociación Argentina De Lucha Contra Mastitis. (1983). Estimación de las pérdidas en volumen de producción de leche provocadas por la mastitis bovina en la República Argentina. *Com. Fed. Lechería Arch. Lechería* 6:73.
- Ávila TS. 1984. Producción intensiva de ganado lechero. Anatomía y fisiología de la glándula mamaria. Edit. Continental. México. pp 139-157. Consultado el 29/07/16 en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090907/090702.pdf>
- Bedolla C.C. (2004). Métodos de detección de la mastitis bovina. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Mimeo. 8 pp. Revista electrónica de veterinaria. ISSN 1695-7504, 8(9), 7-8. Consultado 10/05/16 en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090907/090702.pdf>
- Bedolla, C. et al. (2007). REDVET. Revista electrónica de Veterinaria. ISSN 1695-7504 2007 Volumen VIII Número 9. Consultado el 29/07/16 en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090907/090702.pdf>
- Blowey, R.; Edmondson, P. (1995). Control de la mastitis en granjas de vacuno de leche. Edit. Acribia. Zaragoza. 208-215. Consultado online el 17/11/2015 en <http://ri.ues.edu.sv/1645/1/13100627.pdf>
- Böhm, H. Heeschen W.(1995). Das neueMilchhygienerecht. Edit. Verlag. P. 78 -62. Consultado online el 31/05/16 en <https://core.ac.uk/download/files/342/11227437.pdf>
- Bremel, R. (1980). Membrane filter-deoxyribonucleic acid method of somatic cell counting: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 63: 211-218. Consultado el 29/07/16 en <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/1998/fvm528d/doc/fvm528d.pdf>
- Buelink, D. et al. 1996. Principales cuencas lecheras argentinas. *Sec. Agr., Pesca y Aliment. Subs. Aliment., Depto. de Lechería.* pp. 54. Consultado online el 31/05/16 en http://rafaela.inta.gov.ar/info/documentos/anuarios/anuario2005/a2005_p066.htm
- Callaci, C. R. (2012). Intensificación sustentable de la producción de leche bovina. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Consultado el 28/07/16 en <http://inta.gob.ar/proyectos/PNLEC-071001>
- Calvino, L. F. & Tirante, L. (2005). Prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en argentina en los últimos 25 años. *Revista FAVE - Ciencias Veterinarias* 4 (1-2) 2005 - ISSN 1666-938X. Consultado el 28/07/16 en <https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar/ojs/index.php/FAVEveterinaria/article/viewFile/1413/2261>

- Calvinho, L. F. y col. (2005). Prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en argentina en los últimos 25 años. Revista FAVE - Ciencias Veterinarias 4 (1-2), 30-34. Consultado online el 18/11/2015 en <http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar/ojs/index.php/FAVEveterinaria/article/viewFile/1413/2261>
- Calvinho, L.F. 1998. Diagnóstico bacteriológico de mastitis. En: Primer Seminario Internacional Capacitagro. 115 - 118. Consultado online el 31/05/16 en http://aprocal.com.ar/wp-content/uploads/diagnostico_de_mastitis.htm.pdf
- Cano, J. P. (2006). Nuevas alternativas en el diagnóstico clínico de campo y en el tratamiento de mastitis. Bovinotecnia, boletín técnico virtual, órgano de difusión del DPA Rumiantes FMVZ-UNAM, Volumen 13 Año 5/07. Consultado el 30/07/16 en <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/departamentos/rumiantes/bovinotecnia/BtRgCliC004.htm>
- Carrión, G. M. (2001). Principios básicos para el control de la mastitis y el mejoramiento de la calidad de leche. Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional-Michoacán, Departamento de Recursos Naturales Programa de Apoyo a la Ganadería Regional. pp 28-30. Consultado el 29/07/16 en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090907/090702.pdf>
- Cerón-Muñoz, M. F. et al. (2007). Relación entre el recuento de células somáticas individual o en tanque de leche y la prueba CMT en dos fincas lecheras del departamento de Antioquia (Colombia). Revista colombiana de ciencias pecuarias, 20, 472 – 483. Consultado online el 16-11-2015 en <http://www.scielo.org.co/pdf/rccp/v20n4/v20n4a06>
- Charles A. (1984). Ciencia de la leche. Principios de técnica lechera. Edit. CECOSA, México. 310 pp. Consultado el 29/07/16 en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090907/090702.pdf>
- Cohen J. (1968). Weighted kappa: Nominal scale agreement with provision for scaled disagreement or partial credit. Psychol Bull 1968; 70:213-20.
- Cortés-ReyesÉdgar,Rubio-RomeroJorge Andrés, Gaitán-Duarte Hernando, 2010. Métodos estadísticos de evaluación dela concordancia y la reproducibilidad de pruebas diagnósticas. Educación médica. Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología Vol. 61- No. 3- 2010, (247-255).
- Dieser, S.A., et al (2014). Prevalencia de patógenos causantes de mastitis subclínica en vacas lecheras argentinas. VetPak J, 34 (1): 124-126.
- Djabri B, Barielle N, Beaudreau F, Seegers H. (2002). Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta-analysis. Vet. Res. 33:335-357. Consultado el 28/07/16 en http://www.produccionanimal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_leche/78-mastitis.pdf

- Elsevier B.V. 2006. Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP. *Veterinary Microbiology* 115 (2006) 199–207. www.elsevier.com/locate/vetmic.
- Elsevier B.V. 2008. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis—Not so different from *Staphylococcus aureus*? *Veterinary Microbiology* 134 (2009) 29–36. Journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetmic
- Elsevier B.V. 2008. Coagulase-negative staphylococci—Emerging mastitis pathogens. *Veterinary Microbiology* 134 (2009) 3–8. Journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetmic
- Fernández del Río J. A. 1997. Mastitis. Tema V., en: Calidad y eficiencia en la producción de leche. Manual de procedimientos para la ordeña. Virbac. Departamento técnico. pp. 13-18. Consultado el 29/07/16 en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090907/090702.pdf>
- Gallegos, A. Moncada, J. N. (2011). Uso De Extractos De Semillas De Cítricos Para El Control De La Mastitis Bovina. Consultado el 28/07/16 en http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_leche/78-mastitis.pdf
- García, S. R. (2003). Células somáticas una advertencia sin darnos cuenta. *Holstein de México*. 34 (8): 27-28. Importancia del conteo de células somáticas en la calidad de la leche. *Revista Electrónica de Veterinaria* 9(9) ,16. Consultado online el 18/11/2015 en http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_leche/18-conteo_celulas.pdf
- Gieseck, H.W. (1975). The definition of bovine mastitis and the diagnosis of its subclinical types during normal lactation. *Proceedings of the IDF seminar on mastitis control*. Reading University. Collage of Estate Management. Reading England. 101 – 132. Consultado online el 17/11/2015 en <http://ri.ues.edu.sv/1645/1/13100627.pdf>
- Giraudo, J.; H. Rampone; L. Martí- nez, & A. Calzolari. 1995. Recuento de células somáticas en leche bovina de cuartos mamarios, con y sin aislamiento microbiano. *Rev. Med. Vet. (Bs. As.)* 76: 6-10. Consultado online el 31/05/16 en http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_leche/08-patogenos_de_mastitis.pdf
- González, R. N.; J. A. Giraudo & J. J. Busso. 1980. Investigación en mastitis subclínicas. II Agentes etiológicos bacterianos. *Rev. Med. Vet. (Bs. As.)* 61: 225-234. Consultado online el 31/05/16 en http://www.aprocal.com.ar/wp-content/uploads/mastitis_en_argentina.htm.pdf
- Gordon, W., H. Morris y V. Packard. 1980. Methods to detect abnormal milk. A review. *J. Food Prot.* 43:58-64. Consultado online el 10/05/2016 en <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/1998/fvm528d/doc/fvm528d.pdf>

- Gutman, G.; E. Guiguet & J. Rebolini. 2003. Los ciclos en el complejo lácteo argentino. Análisis de políticas lecheras en países seleccionados. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Programa Calidad de los Alimentos Argentinos. www.alimentosargentinos.gov.ar/programa_calidad/Estudio_lacteo.pdf pp. 267. Consultado online el 31/05/16 en http://www.aprocal.com.ar/wp-content/uploads/mastitis_en_argentina.htm.pdf
- Heringstad, B.; Klemetsdal, G.; Ruane, J. (2000). Selection for mastitis resistance in dairy cattle: a review with focus on the situation in the Nordic countries. *Livestock Production Science*. 64:95-106. Consultado el 28/07/16 en http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_leche/78-mastitis.pdf
- Jaime, L.; Pinzón, G. (1989). Mastitis Bovina I. Tipos, Agentes causales y Diagnósticos. FONAIAP DIVULGA. 31. Consultado online el 18/11/2015 en http://sian.inia.gov.ve/repositorio/revistas_tec/FonaiapDivulga/fd31/texto/mastitis.htm
- Landis JR, Koch GG. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977 Mar; 33:159-74.
- Leidl, W., Schalm O. W., y Lups P. Die Zellzahlbestimmung in der Milch nach Prescott und Breed und ihre Fehlermöglichkeiten. *Milchwissenschaft* 16: 557-567. Consultado el 29/07/16 en <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/1998/fvm528d/doc/fvm528d.pdf>
- Medina CM, y Montaldo VH. (2003). El uso de la prueba de conductividad eléctrica y su relación con la prueba de California para mastitis. CNM. V Congreso Nacional de Control de Mastitis. Aguascalientes, Ags., México. 29-31 de Mayo. Consultado el 29/07/16 en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090907/090702.pdf>
- Medina; Montaldo, VH. (2003). El uso de la prueba de conductividad eléctrica y su relación con la prueba de California para mastitis. CNM. V Congreso Nacional de Control de Mastitis. Aguascalientes, Ags. México. 19-31. Consultado online el 31/05/16 en REDVET. Revista electrónica de Veterinaria. ISSN 1695-7504 2007 Volumen VIII Número 9, <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090907/090702.pdf>
- Pérez CG, Bedolla CC, Castañeda VH. (2005). Importancia del conteo de células somáticas en la cría sustentable de vacas productoras de leche. *Sustentabilidad*. Vol III, No 1. Universidad de Guadalajara, Jalisco., México. pp. 86-94. Consultado el 29/07/16 en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090907/090702.pdf>
- Perez D.M. (1986). Manual sobre ganado productor de leche. Edit. Villicaña S.A., México. pp 710-744. Consultado el 29/07/16 en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090907/090702.pdf>
- Petrovski K.R., M. Trajcev, GJS Buneski. (2006). A review of the factors affecting the costs of bovine mastitis. *Afr Vet Assoc* 77, 52-60.

- Philpot WN. 2001. Importancia de la cuenta de células somáticas y los factores que la afectan. III Congreso Nacional de Control de Mastitis y Calidad de la Leche. Junio de 2001. León, Gto. México. 26 pp. Consultado online el 31/05/16 en REDVET. Revista electrónica de Veterinaria. ISSN 1695-7504 2007 Volumen VIII Número 9, <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090907/090702.pdf>
- Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. (2002). Medicina Veterinaria. Mastitis Bovina. Edit. Mcgraw-hill. 9o Edición. Vol 1. Madrid, España. pp 728, 810. Consultado el 29/07/16 en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090907/090702.pdf>
- SAGPyA, (2003). Cuencas lácteas argentinas. Consultado el 28/07/16 en http://www.agro.uba.ar/apuntes/no_2/lechera.htm
- Sanchez, C. y col. (2012). LA LECHERÍA ARGENTINA: ESTADO ACTUAL Y SU EVOLUCION. ASOCIACION ARGENTINA DE ECONOMIA AGRARIA. Consultado el 28/07/16 en http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-la_lecheria_argentina_estado_actual_y_su_evolucion.pdf
- Saran A, y Chaffer M. 2000. Mastitis y calidad de leche. Inter-Médica. Buenos Aires. 194 pp. Consultado online el 31/05/16 en REDVET. Revista electrónica de Veterinaria. ISSN 1695-7504 2007 Volumen VIII Número 9, <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090907/090702.pdf>
- Saran, A. y Chaffer, M. (2000). Mastitis y calidad de leche. Intermedica, ISBN 9505552254.
- Schlenstedt R, Zschock M, Kloppert B, Wolter W (1997). Occurrence of Prototheca mastitis in dairy farms in Hesse. TierarztlPraxAusg G GrosstiereNutztiere. 25(5): 407-412. Consultado online el 31/05/16 en <http://niv.ns.ac.rs/full/outbmd12.pdf>
- Schrick, F. N., Hockett, M. E., Saxton, A. M., Lewis, M. J., Dowlen, H. H., Oliver, S. P. (2001). Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. J. DairySci. 84:1407-1412. Consultado el 28/07/16 en http://www.produccionanimal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_leche/78-mastitis.pdf
- Servet Talavera (2012). Interpretación de resultados de la prueba de california para mastitis. Consultado el 29/07/16 en http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_leche/78-mastitis.pdf
- Sixtos, E., S. (2011). Frecuencia y etiología de la mastitis bovina en Cherán. Consultado el 28/07/16 en http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_leche/78-mastitis.pdf
- Smith B.P. 1990. Large Animal Internal Medicine. St Louis, Missouri. The C. V. Mosby Co. 89–147. Consultado online el 31/05/16 en <https://core.ac.uk/download/files/342/11227437.pdf>

- Tollersrud, T., Kenny, K., Reitz, A. J. Jr. y Lee, J. C. (2000). Genetic and Serologic Evaluation of Capsule Production by Bovine Mammary Isolates of *Staphylococcus aureus* and Other *Staphylococcus* spp. from Europe and the United States. *Journal of Clinical Microbiology*. 38:2998-3003. Consultado el 28/07/16 en http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_leche/78-mastitis.pdf
- Varela, B. (2002). Clasificación de la mastitis. Consultado el 28/07/16 en <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/2553/1/T-ESPE-IASA%20I-003435.pdf>
- Vissio, C. y col. (2015). Pérdidas productivas y económicas diarias ocasionadas por la mastitis y erogaciones derivadas de su control en establecimientos lecheros de Córdoba, Argentina. *ArchMedVet* 47, 7-14.
- Wellenberg, G.J., van der Poel, W. H. M. y Van Oirschot, J. T. (2002). Viral infections and bovine mastitis: a review. *Veterinary Microbiology*, Article 2361, pp. 2-21. Consultado el 28/07/16 en http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_leche/78-mastitis.pdf
- Xunta de Galicia, Área de Análisis de Salud y Sistemas de Información de Salud de la Organización Panamericana de la Salud. 2006. Manual de ayuda software EPIDAT 3.1. Consultado el 04/07/16 en <http://www.sergas.es/Saudepublica/Documents/1918/Ayuda%20General.pdf>.