



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**COMPARACIÓN DE CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA DE LA LECHE CON EXAMEN
DIRECTO DE LECHE Y CALIFORNIA MASTITIS TEST**

Patricia Andrea Reinoso Aguilera

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Clínicas

PROFESOR GUÍA: Doctor Carlos Núñez.

SANTIAGO, CHILE
2017



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**COMPARACIÓN DE CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA DE LA LECHE CON EXAMEN
DIRECTO DE LECHE Y CALIFORNIA MASTITIS TEST**

Patricia Andrea Reinoso Aguilera

Memoria para optar al Título Profesional
de Médico Veterinario.
Departamento de Ciencias Clínicas

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : DR. CARLOS NÚÑEZ.
PROFESOR CONSEJERO: DR. MARIO DUCHENS
PROFESOR CONSEJERO: DR. JUAN LAZO

SANTIAGO, CHILE
2017

Dedicatoria

A Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

Agradecer a mi familia por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo. María Angélica mi madre, Manuel Segundo mi padre, mis hermanos Paula, Marcelo y Manuel y mis sobrinas Catalina, Fernanda y Antonia, los amo.

A mis amigos que comprendieron mi esencia y fueron actores fundamentales en mi crecimiento, compartiendo experiencias en este andar del saber. Carlos Reinoso, Elizabeth Apeleo, Beatriz Moraga, Andrea Núñez y Gisselle Olivares, muchas gracias.

A mis profesores, cercanos, justos y generosos en su enseñar, imposible nombrarlos a todos porque cada uno fue especial en este difícil aprendizaje con muchos obstáculos pero que ellos hasta el final me entregaron herramientas para lograr los objetivos y ser mejor. Muchas gracias.

A mis animales, no podía no nombrarlos. Quienes me acompañaron siempre y motivaron esta vocación y elección no sólo profesional si no de vida, los amo.

Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos.

Agradecimientos

Esta memoria de título, es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron distintas personas opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dándome ánimo, acompañándome en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad. Este estudio me ha permitido aprovechar la competencia y la experiencia de muchas personas que deseo agradecer en este apartado.

En primer lugar, a mi profesor guía, Dr. Luis Moraga, mis sinceros agradecimiento por haberme aceptado para este estudio, por su paciencia, su entrega y por su valiosa dirección en esta área. Agradecer al Dr. Carlos Núñez primero que todo por aceptarme después de un período de ausencia, por su gran apoyo para seguir este camino de tesis y llegar a la conclusión del mismo.

Al Dr. Hernán Agüero, un especial agradecimiento por haberme recibido y haberme entregado de su valioso tiempo, por sus consejos y su gran sabiduría y paciencia, donde he podido tener la oportunidad de aprender y mejorar puntos importantes de este estudio. Al Dr. Mario Duchens por sus conversaciones y guía frente a mis dudas en el desarrollo de esta memoria de título. Al Dr. Juan Lazo por su comprensión, disposición y tiempo para mi persona.

Mis agradecimientos a los dueños del plantel de leche Pahuilmo Ltda. que permitieron la realización de esta tesis y la colaboración del equipo involucrado en la elección y toma de muestras, Carlos y Francisco, que ocuparon de su tiempo para el desarrollo de la parte práctica de este estudio. Desde luego a mis compañeras de labores en el trabajo en terreno Elizabeth, Paula y Beatriz y mi asesor técnico Manuel.

Agradecer el incondicional apoyo de personas que no nombraré pero que intervinieron desinteresadamente con una palabra o un consejo y que me permitieron continuar y finalizar mi memoria de título.

A todos ustedes mi reconocimientos y gratitud.

Tabla de contenido

RESUMEN	7
SUMMARY	8
INTRODUCCIÓN	9
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
I. Mecanismos de defensa de la glándula mamaria	11
A. Mecanismo de defensa anatómico.....	11
B. Mecanismos de defensa químicos e inmunológicos.....	12
II. Manifestaciones clínicas y subclínicas de la glándula mamaria	14
III. Aspectos epidemiológicos	15
IV. Métodos diagnósticos de mastitis	16
A. Mastitis clínica.....	16
B. Mastitis subclínica	16
i. Daño tisular y alteraciones de la permeabilidad de los capilares sanguíneos, como:.....	16
ii. Respuesta del animal frente a la enfermedad:.....	17
iii. Prueba de Conductividad Eléctrica de la leche (CEL):.....	19
HIPÓTESIS	21
I. Objetivo general	21
II. Objetivos específicos	21
MATERIAL Y MÉTODO	22
I. Ubicación del estudio	¡Error! Marcador no definido.
II. Sistema de identificación	¡Error! Marcador no definido.
III. Población en estudio	¡Error! Marcador no definido.
IV. Conductividad eléctrica de la leche	¡Error! Marcador no definido.
V. Examen Directo de Leche y California Mastitis Test	¡Error! Marcador no definido.
VI. Análisis de Resultados	¡Error! Marcador no definido.
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
I. Comparación de CEL con las pruebas de referencia (EDL y CMT) para los estados de mastitis clínica y mastitis subclínica	¡Error! Marcador no definido.
II. Asociaciones entre los resultados de las Prueba de CEL-EDL y CEL-CMT	¡Error! Marcador no definido.

III. Sensibilidad, Especificidad y Valores Predictivos de la conductividad eléctrica de la leche como prueba diagnóstica del estado clínico y subclínico según pruebas de referencia (EDL y CMT)¡Error! Marcador no definido.

IV. Curva de rendimiento diagnóstico (ROC) de la conductividad eléctrica de la secreción láctea para detección diagnóstica de mastitis clínica y subclínica ¡Error! Marcador no definido.

CONCLUSIONES.....41

ANEXO42

BIBLIOGRAFÍA.....42

Índice de tablas y figuras

TABLA N°1. POBLACIÓN EN ESTUDIO SEGÚN NOP, DL Y CEL.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
TABLA N°2. NÚMERO DE ANIMALES SEGÚN RESULTADO DE CEL	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
TABLA N°3. FRECUENCIAS ABSOLUTAS Y RELATIVAS DE LAS VACAS EN ESTUDIO SEGÚN RESULTADOS COMPARATIVOS ENTRE CEL Y EDL	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
TABLA N°4. FRECUENCIAS ABSOLUTAS Y RELATIVAS DE LAS VACAS EN ESTUDIO SEGÚN RESULTADOS COMPARATIVOS DE CEL Y CMT.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
FIGURA 1: FRECUENCIAS RELATIVAS DE LAS POBLACIONES EN ESTUDIO PARA CEL / EDL.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
FIGURA N°2: FRECUENCIAS RELATIVAS DE LAS POBLACIONES EN ESTUDIO PARA CEL / CMT.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
TABLA N°5. ANÁLISIS DE LA PRUEBA DE χ^2 PARA CEL-EDL	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
TABLA N°6. ANÁLISIS DE LA PRUEBA DE χ^2 PARA CEL-CMT	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
TABLA N°7. SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y VALORES PREDICTIVOS DE CEL EN EL DIAGNÓSTICO DE MC	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
TABLA N°8. SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y VALORES PREDICTIVOS DE CEL EN EL DIAGNÓSTICO DE MSC	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
CURVAS DE ROC DE CEL PARA MC.....	34
FIGURA N°3. CURVA DE RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO PARA MC EN MULTÍPARAS	34
FIGURA N°4. CURVA DE RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO PARA MC EN PRIMÍPARAS.....	34
CURVAS DE ROC DE CEL PARA MSC	35
FIGURA N°5. CURVA DE RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO PARA MSC EN MULTÍPARAS	35
FIGURA N°6. CURVA DE RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO PARA MSC EN PRIMÍPARAS	35
TABLA N°9. INTERPRETACIÓN DEL EXAMEN CMT POR VACA SEGÚN LOS GRADOS OBSERVADOS EN LAS MUESTRAS	42

RESUMEN

Con el fin de evaluar la eficiencia de la conductividad eléctrica de la secreción láctea en la detección de infecciones intramamarias en vacas lecheras, en el presente estudio se compararon distintos métodos diagnósticos de mastitis. El ensayo se realizó en un plantel con sistema confinado donde se trabajó en poblaciones de vacas primíparas y multíparas. Se seleccionaron vacas según la variación de la conductividad eléctrica de la leche (CEL) como positivas y negativas para luego realizarles examen directo de leche (EDL) y California Mastitis Test (CMT) para diagnosticar mastitis clínica (MC) y mastitis subclínica (MSC), respectivamente. Al comparar los distintos métodos diagnósticos, los valores obtenidos para la prueba de Chi-cuadrado fueron bajos, lo que indicó que no existe asociación significativa entre los resultados del diagnóstico obtenidos por la pruebas de CEL, EDL y CMT en los mismos animales. Para evaluar la eficiencia de CEL como método diagnóstico, se determinó sensibilidad y especificidad considerando como pruebas de referencia EDL y CMT. En la población muestreada CEL presentó un 72,0% de sensibilidad y un 38,6% de especificidad en el diagnóstico de MC. Como método diagnóstico de MSC se observó una sensibilidad de un 62,3% y una especificidad de un 38,2% en el total de la población de vacas. Finalmente, se obtuvieron curvas de rendimiento diagnóstico (curva de ROC) para multíparas y primíparas que indicaron que el examen de CEL tiene un bajo valor diagnóstico como prueba. Con estos resultados se concluye que la CEL es un método útil en el diagnóstico de mastitis. Sin embargo, CEL no puede ser la única herramienta diagnóstica para la detección de mastitis, ya que existen otras variables que podrían influir en el estado de salud de la glándula mamaria.

ABSTRACT

In order to evaluate the efficiency of the electrical conductivity of milk in the detection of intramammary infections in dairy cows, in the present study different diagnostic methods for mastitis were compared. The trial was carried out in a confined-system farm where primiparous and multiparous cow populations were studied. Cows were selected according to the variation of the electrical conductivity of the milk (CEL) as positive and negative to then perform direct milk examination (EDL) and California Mastitis Test (CMT) to diagnose clinical mastitis (MC) and subclinical mastitis (MSC), respectively. When comparing the different diagnostic methods, the values obtained for the Chi-square test were low, indicating that there is no significant association between the diagnostic results obtained by the CEL, EDL and CMT tests in the same animals. In order to evaluate the efficiency of CEL as a diagnostic method, sensitivity and specificity were determined considering EDL and CMT as reference tests. In the sampled population, CEL had 72.0% sensitivity and 38.6% specificity in the diagnosis of CM. As a diagnostic method of MSC, a sensitivity of 62.3% and a specificity of 38.2% were observed in the total cow population. Finally, diagnostic yield curves (ROC curves) were obtained for multiparous and primiparous cows that indicated that the CEL measurement has a low diagnostic value as a test. With these results, it is concluded that CEL is a useful method in the diagnosis of mastitis. However, CEL can not be the only diagnostic tool for the detection of mastitis, since there are other variables that could influence the health status of the mammary gland.

INTRODUCCIÓN

La mastitis es un cuadro inflamatorio de la glándula mamaria caracterizado por cambios físico-químicos de la leche, que se manifiestan como alteraciones de las características visibles de la leche y/o de la ubre en el caso de mastitis clínica, o en un incremento en el recuento de células somáticas en el estado subclínico de la mastitis.

Los esfuerzos en el manejo de esta enfermedad van dirigidos hacia el tratamiento y sobre todo a la prevención, tanto de los casos clínicos como de los casos subclínicos. Para ejecutar acciones de tratamiento y evaluar acciones de control se deben emplear métodos adecuados de diagnóstico para diferentes tipos de casos.

Los métodos de exploración clínica empleados para el diagnóstico de la mastitis corresponden al examen directo de la glándula mamaria y de la secreción láctea, siendo fundamental este último método para el diagnóstico eficaz del cuadro clínico.

En el caso de la mastitis subclínica existen variados métodos diagnósticos. Los más empleados se basan en la determinación del recuento de células somáticas en la leche, en forma directa como recuento directo o electrónico de células somáticas (Fossomatic) e indirectos como el “California Mastitis Test” (CMT). Se han desarrollado otros métodos diagnósticos, entre ellos la evaluación de iones, basada fundamentalmente en el aumento de la concentración de cloruros en la leche, la cual se puede medir indirectamente cuantificando la conductividad eléctrica de la secreción láctea. Esta medición puede estar incorporada a equipos de ordeño como ocurre en el sistema Afifarm™, lo que permite medir este parámetro en cada vaca durante el ordeño y de este modo monitorizar instantáneamente la condición sanitaria de la glándula mamaria. La eficiencia de esta metodología para el diagnóstico de mastitis, sobre todo al compararla con el examen directo de leche y el recuento de células somáticas, es o puede ser discutible.

Considerando lo expuesto se realizó este estudio, con el propósito de comparar el valor diagnóstico de la medición de conductividad eléctrica de la leche durante el ordeño en relación a la

determinación indirecta de células somáticas mediante California Mastitis Test y el Examen Directo de Leche (EDL) en los casos de mastitis clínica.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I. Mecanismos de defensa de la glándula mamaria

La infección de la glándula mamaria ocurre cuando se produce el ingreso de algún agente patógeno por el canal del pezón de uno de sus cuartos. Los mecanismos de defensa primarios impiden que los microorganismos atraviesen esta barrera. Si existe traspaso de patógenos, los mecanismos de defensa secundarios, que comprenden al sistema inmune, con varias sustancias químicas y poblaciones celulares en la leche, se encargan de la protección del organismo (Sandholm y Korhonen, 1995).

Los mecanismos de defensa primarios corresponden a la barrera anatómica con que cuenta la ubre y la defensa secundaria tiene relación con factores químicos que actúan en una glándula mamaria sana y aquellos que son activados por procesos inflamatorios e inmunológicos (Sandholm y Korhonen, 1995).

A. Mecanismo de defensa anatómico

El canal del pezón junto con la piel es considerada como la primera barrera de defensa contra los patógenos. La condición de la piel de la ubre es de vital importancia, cuando la piel se encuentra sana la sobrevivencia de los patógenos es muy baja (King, 1981). El estrato córneo actúa como una barrera evitando la penetración de agua, como así también su pérdida desde capas inferiores. Para que la piel mantenga sus características de flexibilidad y suavidad, el contenido acuoso del estrato cornificado deberá mantenerse en un rango de entre 10 – 20 %. Si el contenido de humedad decae por debajo del 10 %, la piel se torna rugosa y predispone a erosiones. Bajo estas condiciones, el contenido ácido de la piel, determinado principalmente por ácido láctico, ácidos grasos libres y aminoácidos, cambiará. Como consecuencia la piel será más propensa a la colonización de patógenos, predisponiendo a los animales a infecciones (Zecconi y Smith, 2000).

El canal del pezón es la principal puerta de entrada a la ubre de numerosos microorganismos causantes de mastitis (Sandholm y Korhonen, 1995). El diámetro del canal pezón, y en menor medida la longitud del mismo, tienen una relación directa con la incidencia de infecciones

intramamarias. A mayor diámetro y mayor largo, mayor tasa de nuevas infecciones. Estudios morfométricos indican que el diámetro del canal del pezón cambia considerablemente durante el periodo seco y la lactancia del animal (NMC, 1996). Se le atribuye una mayor resistencia a infecciones intramamarias a la formación del tapón de queratina en el conducto del pezón, el cual previene el ascenso y multiplicación bacteriana en la glándula. Durante la lactancia, después que la vaca ha sido ordeñada, el canal permanece abierto por aproximadamente dos horas, favoreciendo el ingreso de microorganismos patógenos (Sandholm y Korhonen, 1995; Corbellini, 1998). La información respecto a la acción de la queratina es un poco confusa: Debido a su rica composición en proteínas básicas y ácidos grasos, esta ejercería cierta actividad bactericida (Sandholm y Korhonen, 1995). No obstante, otros trabajos demuestran que la queratina actuaría ejerciendo un efecto físico, de adsorción de las bacterias, impidiendo su paso y posterior colonización de la glándula, más que un efecto bactericida, luego las bacterias retenidas en la queratina, más las células en proceso normal de descamación, son removidas por la columna de leche durante la ordeña (Corbellini, 1998).

B. Mecanismos de defensa químicos e inmunológicos

Las concentraciones de factores antibacterianos en la secreción de la glándula mamaria están relacionadas con aspectos genéticos y la salud mamaria depende de la presencia de estos factores. Generalmente, los factores antibacterianos se concentran en la secreción de la glándula durante el período seco y son abundantes en el calostro. Sus concentraciones son más bajas durante el pic de lactancia, pero aumentan considerablemente cuando la ubre está inflamada (Sandholm y Korhonen, 1995).

La inflamación de la ubre está acompañada por cambios en el tejido glandular. Estos cambios dependen del tipo de microorganismos que causen la inflamación y de la severidad de la infección (Rosenberger, 1994). El cuadro inflamatorio se presenta luego que los microorganismos causantes de la mastitis penetran en la glándula, se multiplican en el tejido productor de leche y liberan toxinas. La presencia de bacterias, toxinas y otros componentes provoca una serie de procesos inmunológicos en que los leucocitos se trasladan desde la sangre hacia la leche para destruir a los microorganismos invasores. Así mismo, ingresan al cuarto infectado fluidos provenientes del

torrente sanguíneo y del sistema linfático con el objeto de diluir las toxinas bacterianas. Este flujo sanguíneo, linfático y la migración de leucocitos hacia el tejido glandular afectado (cuarto) constituye la respuesta inflamatoria (Philpot y Nickerson, 2000).

Los factores de defensa celular o humoral de la leche, como ya se dijo, tienen un efecto antibacterial. En estos, intervienen los leucocitos polimorfos nucleares (PMN), los linfocitos y los macrófagos. Los factores humorales son las inmunoglobulinas, los factores del complemento, el sistema lactoperoxidasa-tiocianato-peróxido-hidrógeno, la lactoferrina y la lisozima (Wolter y Klopper, 2004).

El paso activo de leucocitos sanguíneos a la luz alveolar es uno de los mecanismos naturales más importantes de defensa contra la mastitis. En el caso de una glándula mamaria sana se puede observar un contenido menor de cien mil leucocitos por mililitro de leche. El contenido de leucocitos aumenta como una respuesta a los microorganismos invasores. En el caso de la mastitis aguda, los conteos pueden llegar a millones de células somáticas por mililitro. Los leucocitos más numerosos durante el curso de una mastitis son los granulocitos polimorfo nucleares (PMN), sin embargo pueden pasar de 12 a 24 horas después de la infección antes de que el contenido de PMN aumente claramente (Wolter y Klopper, 2004).

Entre los factores humorales más relevantes podemos mencionar la lactoferrina, una proteína con capacidad para fijar el hierro (Fe), producida por las células epiteliales y fagocitos de la glándula mamaria (Sandholm y Korhonen, 1995). En la leche normal, su concentración es baja, pero se incrementa durante la involución de la glándula o durante algún proceso inflamatorio (Smith y Oliver, 1981). Además existen cuatro clases de inmunoglobulinas (Ig) descritas en la glándula mamaria, IgA, IgE, IgG (IgG1, IgG2) e IgM (Butler, 1986), las cuales pueden ser producidas en la misma glándula o derivar del torrente sanguíneo (Tizard, 1996). La concentración de Igs en la glándula varía de acuerdo al momento de la lactancia y al grado de salud de la misma. En leche normal su concentración es relativamente baja (50 – 150 mg/ml) en comparación con el calostro, o con la glándula inflamada, incrementándose en este último caso entre 2 y 3 veces sobre el valor normal (Sordillo *et al.*, 1987; Norcross, 1991).

II. Manifestaciones de la glándula mamaria

La inflamación de la glándula mamaria con manifestaciones clínicas se caracteriza por anormalidades visibles de la leche y/o del tejido mamario, cuya severidad según el agente actuante varía mucho en el curso de la enfermedad. Pueden observarse cuartos eritematosos, o bien, zonas induradas a la palpación. En la secreción láctea las anormalidades van desde presencia de pus, grumos, flóculos, hasta exudados sanguinolentos o serosos. La mastitis clínica generalmente es causada por estafilococos, estreptococos o coliformes (Philpot y Nickerson, 2000).

El estado subclínico no puede ser detectado directamente, ni en la ubre, ni en la leche, ya que ambas tienen apariencia normal. Deben ser utilizadas otras herramientas diagnósticas tales como, recuento de células somáticas, detección de iones u otras modificaciones bioquímicas de la leche. (Tinsky, 1995). Las principales modificaciones de la glándula mamaria inflamada incluyen (1) traspaso de iones, proteínas y enzimas desde el torrente sanguíneo a la secreción láctea debido a un aumento en la permeabilidad, (2) infiltración de células fagocíticas en el parénquima mamario, (3) y una disminución de las concentraciones de ciertos componentes de la leche (Pyörälä, 2003); esto se ve reflejado en la modificación de la composición química de la leche, por la disminución de materia grasa y sólidos no grasos, especialmente lactosa, siendo compensado este descenso, en parte, por el aumento de sodio y cloro proveniente del torrente sanguíneo, restableciéndose así el equilibrio de la presión osmótica de la glándula mamaria. En relación a las proteínas, se ha descrito disminución de la caseína, aumento de globulinas y albúmina sanguínea (Schalm, 1977).

III. Aspectos epidemiológicos

Se debe tener presente que la mastitis es el resultado de la interacción entre muchos factores, tales como susceptibilidad de la vaca, condiciones ambientales, con los microorganismos a los que están expuestos los pezones, patogenicidad agente causal, estrés, manejo de los animales, rutina e higiene del ordeño, estado de funcionamiento del equipo de ordeña y desempeño de quienes manipulan e interactúan con las vacas (Philpot, 1999).

La mastitis se puede clasificar según presencia o ausencia de signos en mastitis clínica y mastitis subclínica (Blood *et al.*,1992).

Epidemiológicamente, se denomina mastitis contagiosa el cuadro causado por bacterias gram positivas que viven casi exclusivamente dentro de la ubre. Las bacterias contagiosas más importantes son: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma bovis* y *Corynebacterium bovis*. Algunos de estos microorganismos pueden vivir en el ambiente, pero el reservorio principal de cepas patógenas son las ubres de animales infectados. Típicamente se transmiten de un animal enfermo a un animal sano durante el ordeño o inmediatamente después de este (Ruegg, 2003).

La mastitis ambiental, es causada por bacterias gram positivas (*Streptococcus spp.*) y gram negativas (coliformes) que viven en el ambiente que rodea a la vaca, como camas, cubículos, estiércol, suelo y el agua. Las bacterias penetran la ubre durante el ordeño o el intervalo entre ordeños a través del esfínter del pezón. Los estreptococos ambientales más comunes son: *Streptococcus uberis* y *Streptococcus dysgalactiae*. Las bacterias coliformes más comunes son: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* y *Enterobacter aerogenes*. Otros microorganismos oportunistas que también pueden causar mastitis ambiental son: *Pseudomonaaeruginosa*, *Actinomyces pyogenes*, *Nocardia asteroides*, *Bacillus cereus*, *Serratia marcescens* y *Candida albicans* (Ruegg, 2003).

IV. Métodos diagnósticos de mastitis

La mastitis se diagnostica mediante métodos de exploración clínica, por exámenes en la sala de ordeño y mediante métodos de laboratorio, que detectan la presencia de inflamación (Philpot y Nickerson, 2000).

A. Mastitis clínica

En el caso de mastitis clínica, cuartos o leche anormales pueden detectarse visualmente gracias a la respuesta inflamatoria. El examen directo de la glándula puede detectar el estado clínico mediante inspección y palpación de la ubre, al igual que con el examen directo de leche, que se realiza mientras se prepara la ubre para el ordeño, donde se observan los primeros chorros de leche detectando la que es clínicamente anormal (Philpot y Nickerson, 2000).

B. Mastitis subclínica

Existen diversos métodos diagnósticos:

i. Daño tisular y alteraciones de la permeabilidad de los capilares sanguíneos, como:

- a. Detección de iones Na^+ , K^+ , Cl^- : Prueba de Cloruros, que es un método directo. Es una prueba cuantitativa, que se basa en un análisis volumétrico. Los cloruros en la leche normal permanecen constantes de 0,09 a 0,14 %. Este porcentaje aumenta en caso de leches mastíticas o con otra afección de la glándula mamaria. La concentración de iones en la leche varía no solamente por el aumento de la capilaridad, sino también por el daño activo del sistema de transporte. Este sistema es muy activo, existiendo paso de sodio al fluido extracelular y de potasio al intracelular. En el caso de la desintegración de las células secretoras, los iones contenidos en el fluido intracelular entran en la cámara alveolar. Estos cambios de

la concentración de iones causan un aumento de la CEL (Spakauskas y Klimiene, 2006).

- b. Determinación de enzimas: Prueba de la N-Acetil-β-D-Glucosaminidasa (NAGasa), beta-glucuronidasa y catalasa (Kitchen *et al.*, 1980). Muchas enzimas aumentan en la leche durante la inflamación. Las enzimas relacionadas con la síntesis de la leche disminuyen y las relacionadas con la inflamación aumentan. Las enzimas que provienen de los fagocitos aumentan exponencialmente. Ellas incluyen NAGasa, la beta-glucuronidasa y catalasa. Estas enzimas lisosomales han resultado ser indicadores confiables de inflamación. La NAGasa es una enzima intracelular que es liberada en la leche durante la fagocitosis de neutrófilos y lisis de la célula, y en algún grado produce daño a las células epiteliales de la ubre (Pyörälä, 2003).

ii. Respuesta del animal frente a la enfermedad:

- a. Métodos directos: Recuento microscópico directo de células somáticas, Métodos electrónicos (Fossomatic) (Kitchen, 1981). Recuento de células somáticas (RSC): Las células somáticas están compuestas de leucocitos y ocasionalmente de células epiteliales y es lo que se mide en un mililitro de leche para chequear el estado de salud de la glándula mamaria en los planteles lecheros. Normalmente en la leche de vacas no infectadas aparecen neutrófilos (1 a 11 %), macrófagos (66 a 88 %), linfocitos (10 a 27 %) y células epiteliales (0 a 7 %). El RCS de una vaca que no está cursando mastitis, es por lo general, menos de 200.000 cs/ml y muchas vacas mantienen los valores de RCS de menos de 100.000 cs/ml. Cuando la glándula mamaria está cursando mastitis, existen señales de defensa del sistema inmune donde los macrófagos generan una respuesta frente a la inflamación generándose un aumento en los neutrófilos que van a fagocitar las bacterias causantes de la mastitis. Más del 90 % del RCS en glándulas infectadas está compuesto de neutrófilos y un RCS mayor que 200.000 cs/ml es un indicador de mastitis (Ruegg, 2002).

- b. Métodos indirectos: El Test Whiteside. Se basa en determinar el aumento de leucocitos en la secreción láctea con mastitis. Para este propósito, una solución de hidróxido de sodio al 4% se hace reaccionar en volúmenes idénticos con la leche en estudio, 3 ml de una solución de NaOH y 3ml de leche, resultando positiva la prueba con la formación de gel de la mezcla (Schalm, 1971 citado por Muhammad *et al.*, 2011). El test de Wisconsin. Es una prueba de laboratorio que puede ser utilizada en leche fresca o de estanque para realizar recuento de células somáticas, mediante un tubo graduado en milímetros, donde se depositan 2 ml de leche con 2 ml de reactivo (lauril sulfato de sodio) y agua destilada en una relación 1:1; enseguida se agita por diez segundos, se deja reposar diez segundos y luego se invierten los tubos durante otros diez segundos, se cuantifica según viscosidad, los resultados se relacionan con la escala graduada en mililitros de tubo y el valor de las células somáticas, cuando los valores son superiores a un millón de células somáticas, es una glándula mamaria con mastitis (Bedolla *et al.*, 2007). California Mastitis Test (CMT). Consiste básicamente en exponer una muestra de leche a un reactivo que provoca un incremento en la viscosidad de ésta cuando existe mastitis. Se basa en una evaluación de la respuesta del sistema inmunitario del animal ante la enfermedad con un incremento de células defensivas en la sangre, que viajan por el torrente sanguíneo a la glándula mamaria y aumentan en la forma proporcional a la inflamación. El reactivo del CMT consta de un detergente que reacciona con el ADN de las células somáticas y un colorante indicador de pH induciendo la formación de un gel de distinta viscosidad y cambio de color de la leche, dependiendo del recuento de células somáticas (Rosenberger, 1994; Pérez. *et al.*, 2008). CMT es una prueba rápida, económica y que detecta en forma indirecta el aumento de células somáticas en la leche. Según la reacción observada, se clasifica la mastitis subclínica en Trazas, cuando se observa una ligera formación viscosa; en Grado 1, cuando hay una clara formación viscosa inmediatamente después de realizada la mezcla; en Grado 2, cuando además de una clara solución viscosa el líquido forma una masa periférica y queda expuesto el fondo de la paleta y Grado 3 cuando la viscosidad alcanza su máximo, y la superficie de la solución se vuelve convexa o adquiere forma de cúpula (Schalm, 1977). CMT es una prueba de terreno

confiable para detectar mastitis subclínica, desarrollada para ser utilizada en cuartos individuales aunque también se ha usado en muestras compuestas de cada vaca, con leche fresca o refrigerada. Si se usa leche almacenada, la muestra de leche debe ser homogenizada antes de la prueba de CMT (Ruegg, 2002).

Actualmente, las pruebas más utilizadas para detectar mastitis subclínica que pueden ser usadas en la sala de ordeña son el CMT y la medición de la CEL (Pyörälä, 2003).

iii. Prueba de Conductividad Eléctrica de la leche (CEL):

Es una prueba que mide de forma indirecta la concentración de iones (Hammer y Bailey, 1917 citado por Molina, 1988). La medición de la conductividad eléctrica de la leche (CEL) para detectar mastitis está basada en los cambios iónicos que ocurren durante la inflamación (Pyörälä, 2003). La CEL está determinada por la concentración sodio, potasio, calcio, magnesio, cloro, y otros iones (Barth *et al.*, 2000 citados por Spakauskas y Klimiene, 2006). CEL se ha utilizado como un indicador de la mastitis, basado en el aumento de la conductividad eléctrica de la leche debido a su mayor contenido electrolítico, especialmente de iones de sodio y cloro, utilizándose como método para monitorear el estado de la mastitis en vacas individuales (Norberg *et al.*, 2004).

Se encuentra incorporada a algunos equipos de ordeña, con sistemas en línea que identifica de forma individual a las vacas, así como también en forma de medidores portátiles, lo que permite la monitorización individual por cuarto (Norberg *et al.*, 2004; Elizalde *et al.*, 2009). Como este sistema entrega información sobre la producción láctea, el número de partos y los días de lactancia de cada vaca, contribuye a un análisis del rebaño en cuanto a la incidencia de mastitis y de diferentes subpoblaciones dentro del rebaño (Bedolla *et al.*, 2007).

La conductividad eléctrica es una medida de la resistencia al paso de la corriente eléctrica por la leche, por lo que, numéricamente es el recíproco de la citada medida de resistencia. La unidad de medida para CEL es el milisiemens por centímetro (mS/cm). La conductividad eléctrica típica de la leche varía entre 4,0 y 5,5 mS/cm a 25°C (Ruegg, 2002); utilizándose **límites o valores máximos**

para diagnosticar mastitis en muestras de leche compuestas (por vaca, rebaño o estanque) o de cuartos mamarios (Maatje, 1992; Lansbergen, 1994).

Los modelos de diagnóstico basados en valores máximos de CEL y análisis en tiempos seriados frecuentemente han mostrado resultados prometedores para la detección de la mastitis. Sin embargo, existen vacas enfermas que no son detectadas y vacas sanas que son clasificadas como enfermas, lo que indicaría respectivamente baja sensibilidad y baja especificidad para este método diagnóstico. Esto se puede explicar en parte por una interpretación inadecuada de la medición de CEL (Norberg *et al.*, 2004). Se ha sugerido que al considerar solamente los valores altos de CEL, puede omitirse información importante para la interpretación diagnóstica (Lake, 1992; Nielen, 1992).

Por otra parte, la mastitis no es la única causa del cambio del contenido iónico de la leche: Existen factores no relacionados con la mastitis que influyen en el contenido iónico, entre éstos, la temperatura de la leche (CEL aumenta 0,113 mS/cm por grado Celsius en muestras de la leche), la etapa de lactancia, el porcentaje de grasa (la grasa no es conductor eléctrico), el intervalo del ordeño y la raza (Ruegg, 2002). Además las vacas que presentan mastitis no siempre muestra una CEL alta del cuarto infectado, **pero el valor en CEL de un cuarto infectado puede ser mayor que el valor en CEL de la leche de cuartos sanos**. Es por ello que la medición por cuarto que por animal y una combinación del valor absoluto y la variación de las medidas de la CEL puede mejorar este indicador de mastitis (Norberg *et al.*, 2004).

Los sistemas computacionales tienen un potencial en la evaluación de mastitis clínica y mastitis subclínica debido a que se cuenta con los datos de cada ordeña y no con muestras tomadas sólo en determinados momentos, por lo que se puede realizar análisis basados en las variaciones de CEL que han ocurrido en el transcurso del tiempo en las vacas y en el rebaño (Nielen, 1995). Algunos de los sistemas de ordeño automatizados tienen sensores incorporados para medir CEL durante la ordeña (Kitchen, 1981), por lo tanto, CEL puede ser usada para el diagnóstico de mastitis. Sin embargo, los datos sobre el valor diagnóstico de este método son contradictorios (Hamann *et al.*, 2000 citados por Spakauskas y Klimiene, 2006).

HIPÓTESIS

La variación de conductividad eléctrica de la leche (CEL) es un indicador confiable de mastitis.

I. Objetivo general

Comparar la conductividad eléctrica de la leche con el examen directo de leche y California Mastitis Test.

II. Objetivos específicos

Comparar la prueba de conductividad eléctrica de la leche (CEL) con examen directo de leche (EDL) para el diagnóstico de mastitis clínica (MC).

Comparar la Prueba de conductividad eléctrica de la leche con California Mastitis Test (CMT) para el diagnóstico de mastitis subclínica (MSC).

MATERIAL Y MÉTODO

I. Ubicación del estudio

Este estudio se realizó en la lechería Sociedad Agrícola Pahuilmo Ltda., ubicada en el Valle de Mallauraco, provincia de Melipilla, Región Metropolitana. El sistema de producción corresponde a un sistema de confinamiento permanente con distintos grupos de manejo de acuerdo a la cantidad de partos, estado sanitario, estado fisiológico y productivo de los animales.

Durante el período de estudio, se encontraban en lactancia aproximadamente 830 vacas Holstein Friesian, con una producción promedio de 31 litros diarios de leche por vaca.

El plantel cuenta con una sala de ordeña giratoria de cuarenta puestos, en la que se ordeñan las vacas tres veces al día. La primera ordeña es a las 4 AM, la segunda a las 12 PM y la tercera a las 7 PM.

Se utilizan dos sistemas de alojamiento de vacas: Corrales con cubículos individuales (“free stall”), con cama de arena y en corrales de tierra (“dry lot”).

La alimentación consiste en una ración completa formulada según número ordinal de partos, estado fisiológico y nivel de producción. La ración se entregaba dos veces al día en comederos colectivos ubicados a lo largo de cada corral.

II. Sistema de identificación

Las vacas se identificaron con autocrotales numerados en las orejas además de un sistema de identificación electrónica mediante un podómetro, el cual se fija por encima de la articulación metatarso-falángica izquierda, siendo generalmente instalado el tercer día de lactancia.

Un sistema de lectura dentro de la sala de ordeña (Afimilk®) identifica el podómetro al momento en que la vaca ocupa un puesto, registra los datos por vaca y del rebaño. Los datos así obtenidos se almacenan por medio del software para manejo de rebaños Afifarm™, para su posterior análisis. Se trata de un software automatizado para manejar planteles de explotación intensiva. Esta tecnología entrega datos referentes al estado sanitario del rebaño y del animal, por lo que se dispone continuamente de información individual, la que incluye producción de leche, número de partos, días en lactancia y conductividad eléctrica de la leche, además de datos relacionados con su fertilidad y nutrición.

III. Población en estudio

Se examinaron 311 vacas durante cuatro meses. La población se estratificó según número ordinal de parto (NOP) en 215 multíparas y 96 primíparas, y se agruparon según la conductividad eléctrica de la leche (CEL) en 194 positivas y 117 negativas.

IV. Medición de la conductividad eléctrica de la leche

Cada vaca fue seleccionada al azar posterior al primer ordeño y fue asignada a un grupo determinado según los valores de CEL. Se separaron multíparas de primíparas y en las multíparas se realizó dos subgrupos según los días en leche (DL), con valores de la conductividad eléctrica superior a los valores típicos de CEL que van de 4,0 a 5,5 mS/cm, porque en este grupo pueden existir aumentos asociados a factores como edad, estro y gestación. En la tabla N° 1 se entrega el criterio para seleccionar a las vacas como positivas a CEL, considerándose negativas las que presentaban valores de CEL menores a los indicados en dicha tabla.

Tabla N°1. Criterio para seleccionar vacas como positivas.

NOP	Múltiparas		Primíparas
DL	1-100	101-280	1-280
CEL (mS/cm)	≥7,0	≥10,0	≥6,0

Una vez finalizado el primer ordeño (AM), se revisaron los datos actualizados del rebaño entregados por el software Afifarm™ con el sistema afimilk, con el fin de seleccionar los animales positivos y negativos a mastitis según **los valores individuales de la CEL por vaca.**

V. Examen Directo de Leche y California Mastitis Test

En el segundo ordeño (AM/PM), se identificaron las vacas (positivas y negativas a CEL) que habían sido seleccionadas al azar según el criterio de la tabla N° 1. A las 311 vacas en estudio se les realizó las pruebas de referencia (EDL y CMT) para el diagnóstico de mastitis clínica y mastitis subclínica, respectivamente.

Las vacas fueron sometidas primeramente a examen directo de leche además se inspeccionó y palpó la glándula mamaria, con el fin de contribuir a evaluar el estado sanitario de la ubre. A continuación, se eliminaron los primeros chorros para luego recolectar en la paleta para CMT una muestra de leche para ver anomalías macroscópicas del fluido tales como grumos, acuosidad o exudado sanguinolento. **Si la hembra presentaba alteraciones visibles de la leche en uno de los cuartos, se daba por positiva a mastitis clínica.**

Luego se realizó la prueba de CMT, aplicando el reactivo a cada receptáculo de leche y después de 15 segundos se realizó la lectura del recuento de células somáticas según la viscosidad y coloración de la reacción de la muestra de leche, **siendo positivas a mastitis subclínica a aquellas hembras que presentaban grados 1, 2 ó 3, en uno o más receptáculos de la paleta de CMT.**

Análisis de Resultados

Los resultados se analizaron considerando tres grupos de animales, vacas multíparas, vacas primíparas y población total en estudio.

Se trabajó con tablas de contingencia para la tabulación de los datos donde se calcularon frecuencias absolutas y frecuencias relativas comparando las CEL con las pruebas de referencia (EDL y CMT) para evaluar la distribución de las poblaciones de vacas multíparas y de primíparas según positivas y negativas a la prueba en estudio.

Mediante la prueba de Chi-cuadrado de Pearson, se estudió la asociación de los resultados de la CEL, con los resultados obtenidos de EDL y CMT.

Para evaluar el valor diagnóstico de la prueba de CEL se determinó su sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo, en la detección de MC y MSC, mediante EDL y CMT, respectivamente.

Finalmente, se analizaron las curvas de rendimiento diagnóstico o Receiver Operating Characteristic (ROC) de CEL. Se gráfico la curva de ROC que estima la eficiencia diagnóstica de las pruebas de referencias (EDL y CMT), la cual es una representación gráfica de la sensibilidad frente a [especificidad-1], donde se interpreta que entre más cerca esté la curva del ángulo izquierdo superior del gráfico, se obtiene un mayor rendimiento diagnóstico.

Se calcularon las frecuencias de animales negativos verdaderos, positivos verdaderos, falsos negativos y falsos positivos a la prueba de CEL, según los resultados obtenidos en los mismos animales con EDL. El mismo agrupamiento se estableció según los resultados con la otra prueba de referencia (CMT). La frecuencias así obtenidas fueron comparadas en forma descriptiva.

Los análisis estadísticos se efectuaron utilizando el programa estadístico InfoStat Versión 2004.

RESULTADOS

De la población total, 194 animales presentaron valores de Conductividad Eléctrica de la Leche (CEL) mayores a los valores establecidos en la Tabla N°1 según los días en leche para los grupos definidos, de las cuales 132 eran vacas multíparas y 62 primíparas. Las vacas con valores inferiores fueron 117, siendo 83 multíparas y 34 primíparas.

Tabla N°2. Frecuencia de animales según resultado de CEL

	Positivas a CEL	Negativas a CEL	Pob. Total
Multíparas	132	83	215
Primíparas	62	34	96
Total	194	117	311

Con los datos señalados anteriormente, de acuerdo a MC y MSC se comparó la positividad a Conductividad Eléctrica de la Leche (CEL) con Examen Directo de Leche (EDL) y el California Mastitis Test (CMT) para evaluar la eficiencia de CEL como método diagnóstico en los cuadros de mastitis clínica y subclínica, respectivamente.

I. Comparación de CEL con las pruebas de referencia (EDL y CMT) para los estados de mastitis clínica y mastitis subclínica

En la Tabla N° 3 se comparan los resultados para mastitis clínica obteniendo los casos coincidentes y divergentes respecto de ambas pruebas.

De este modo, se observó que los casos en que los resultados coinciden para ambas pruebas, Negativo\Negativo y Positivo\Positivo a CEL y al EDL, corresponden a un 41,2%. Para la población total en ambas pruebas evaluadas comparativamente, las vacas negativas a CEL y al EDL tienen una coincidencia de 35,4% y las vacas con mastitis clínica positiva a CEL y al EDL coinciden en un 5,8%.

Al analizar los resultados de las pruebas a CEL y al EDL existe un 58,8% de divergencias, es decir, existen falsos negativos correspondientes a un 2,2% y falsos positivos correspondientes a un 56,6% respecto de la población total examinada.

Tabla N°3. Frecuencias absolutas y relativas de las vacas en estudio según resultados comparativos entre CEL y EDL

CEL \ EDL	Negativo \ Negativo	Positivo \ Positivo	Resultados Coincidentes CEL \ EDL	Negativo \ Positivo	Positivo \ Negativo	Resultados Divergentes CEL \ EDL	Población Total
Múltiparas	79	13	92	4	119	123	215
	36,7%	6,1%	42,8%	1,9%	55,3%	57,2%	100,0%
Primíparas	31	5	36	3	57	60	96
	32,3%	5,2%	37,5%	3,1%	59,4%	62,5%	100,0%
Pob. Total	110	18	128	7	176	183	311
	35,4%	5,8%	41,2%	2,2%	56,6%	58,8%	100,0%

En la segunda parte del estudio, Tabla N°4 se comparan los resultados para mastitis subclínica obteniendo los casos coincidentes y divergentes respecto de ambas pruebas, del mismo modo como se analizó CEL y EDL.

De este modo, se observó que los casos en que los resultados coinciden para ambas pruebas, Negativo\Negativo y Positivo\Positivo a CEL y a CMT corresponden a un 50,8%. Para la población total de ambas pruebas comparativas, las vacas negativas a CEL y a CMT, tienen una coincidencia de 17,4% y las vacas con mastitis subclínica positiva a CEL y a CMT coinciden en un 33,4%.

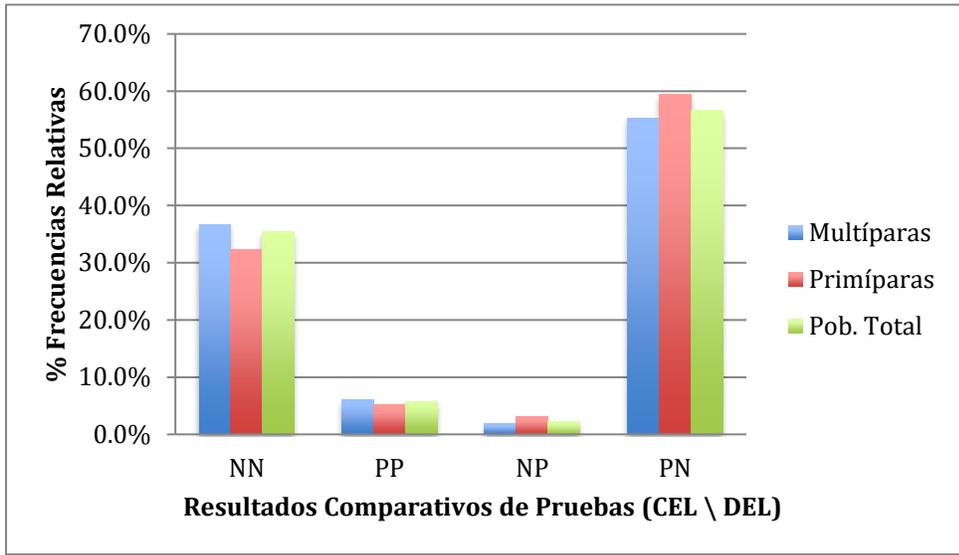
Al analizar los resultados de las pruebas a CEL y a CMT existe un 49,2% de divergencias, es decir, existen falsos negativos correspondientes a un 20,3% y Falsos Positivos correspondientes a un 28,9% respecto de la población total examinada.

Tabla N°4. Frecuencias absolutas y relativas de las vacas en estudio según resultados comparativos de CEL y CMT

CEL \ CMT	Negativo \ Negativo	Positivo \ Positivo	Resultados Coincidentes CEL \ CMT	Negativo \ Positivo	Positivo \ Negativo	Resultados Divergentes CEL \ CMT	Población Total
Múltiparas	35	74	109	48	58	106	215
	16,3%	34,4%	50,7%	22,3%	27,0%	49,3%	100,0%
Primíparas	19	30	49	15	32	47	96
	19,8%	31,3%	51,0%	15,6%	33,3%	49,0%	100,0%
Pob. Total	54	104	158	63	90	153	311
	17,4%	33,4%	50,8%	20,3%	28,9%	49,2%	100,0%

Al analizar las frecuencias absolutas y relativas de los resultados obtenidos en este estudio, se observa que en ambas comparaciones de las pruebas de referencia entre EDL y CMT con CEL, los resultados de coincidencias y divergencias tienden a ser semejantes para múltiparas, primíparas y población total, como se muestra en las Figuras N°1 y N°2.

Figura 1: Frecuencias relativas de las poblaciones en estudio para CEL / EDL



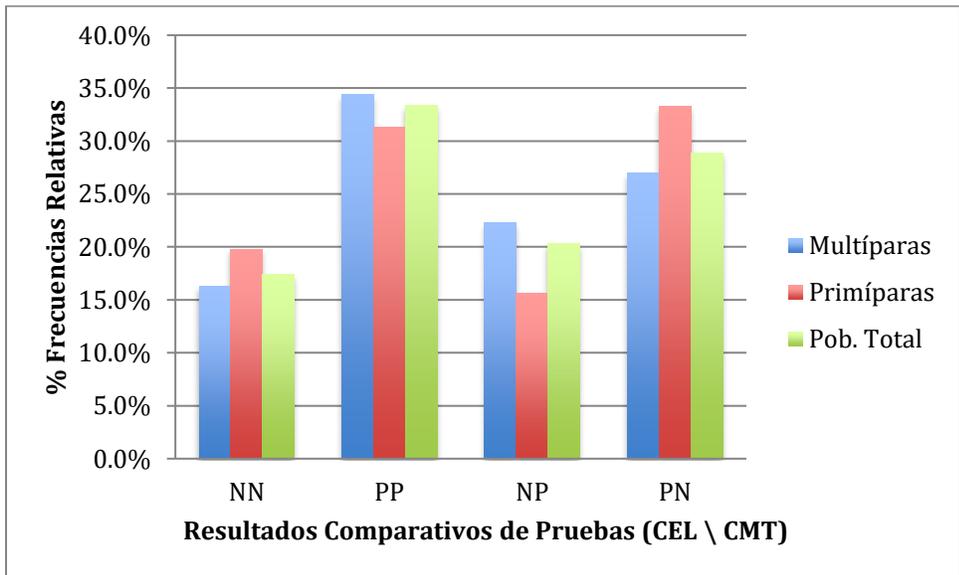
NN: Negativas a CEL y Negativas a EDL.

NP: Negativas a CEL y Positivas a EDL.

PP: Positivas a CEL y Positivas a EDL.

PN: Positivas a CEL y Negativas a EDL.

Figura N°2: Frecuencias Relativas de las poblaciones en estudio para CEL / CMT



NN: Negativas a CEL y Negativas a CMT.

NP: Negativas a CEL y Positivas a CMT.

PP: Positivas a CEL y Positivas a CMT.

PN: Positivas a CEL y Negativas a CMT.

II. Asociaciones entre los resultados de las Prueba de CEL-EDL y CEL-CMT

Las tablas N° 5 y 6 corresponden al análisis de las funciones presentadas en las tablas N° 3 y 4, usando la prueba de Chi-Cuadrado de Pearson, con un grado de libertad y un 5% de significancia, corregido según Yates, debido a que existieron algunos valores en las frecuencias obtenidas inferiores a cinco.

Tabla N°5. Análisis de la prueba de χ^2 para CEL-EDL

Población	Prueba De referencia	D (x)	P. de χ^2	P	Corregido según Yates	Probabilidad
Múltiparas	EDL	MC	1,77	0,18	1,15	0,28
Primíparas	EDL	MC	0,02	0,90	0,07	0,80
Pob. total	EDL	MC	1,07	0,30	0,67	0,41

Tabla N°6. Análisis de la prueba de χ^2 para CEL-CMT

Población	Prueba De referencia	D (x)	P. de χ^2	P	Corregido según Yates	Probabilidad
Múltiparas	CMT	MSC	0,07	0,79	0,01	0,91
Primíparas	CMT	MSC	0,16	0,69	0,04	0,85
Pob. Total	CMT	MSC	0,02	0,90	0,00	0,99

En las tres poblaciones, para las dos comparaciones, los valores obtenidos del estadígrafo Chi-cuadrado fueron bajos, aceptándose la hipótesis nula, es decir, que para ambas subpoblaciones y población total en estudio, no existe asociación estadísticamente significativa entre los resultados del diagnóstico con las pruebas de referencia (EDL y CMT) y CEL.

III. Sensibilidad, Especificidad y Valores Predictivos de la conductividad eléctrica de la leche como prueba diagnóstica del estado clínico y subclínico según pruebas de referencia (EDL y CMT)

Con el objetivo de evaluar la eficiencia como método diagnóstico de CEL, se determinó la sensibilidad, especificidad y los valores predictivos de la prueba, considerando como pruebas de referencia o gold standard, los exámenes de EDL y CMT.

Tabla N°7. Sensibilidad, especificidad y valores predictivos de CEL en el diagnóstico de MC

Población	Sensibilidad %	Especificidad %	Valor predictivo positivo %	Valor predictivo negativo %
Múltiparas	76,5	39,9	9,9	95,2
Primíparas	62,5		8,1	91,2
Pob. Total	72,0	38,6	9,3	94,0

Tabla N°8. Sensibilidad, especificidad y valores predictivos de CEL en el diagnóstico de MSC

Población	Sensibilidad %	Especificidad %	Valor predictivo positivo %	Valor predictivo negativo %
Múltiparas	60,7	37,6	56,1	42,2
Primíparas	66,7	37,3	48,4	55,9
Pob. Total	62,3	38,2	53,6	46,2

De las tablas N°7 y 8 se desprende que:

- La probabilidad de detectar múltiparas efectivamente afectados por MC fue de un 76,5% alcanzando en primíparas un valor 62,5% y en la población total a 72,0%.

- La probabilidad de detectar multíparas no afectadas por MC fue de 39,9%; alcanzando en primíparas un valor de 35,2% y en la población total a 38,6%.
- La proporción de vacas con MC en multíparas, detectadas por CEL fue de 9,9%. En primíparas de un 8,1% y 9,3% en el total de la población.
- La proporción de vacas con MC en multíparas, no detectadas por CEL fue de 95,2%. En primíparas de un 91,2% y 94,0% en la población total.
- La probabilidad de detectar multíparas efectivamente afectadas por MSC mediante análisis de CEL fue de un 60,7% ; alcanzando en primíparas y en la población total valores de 66,7% y de 62,3%, respectivamente.
- La probabilidad de diagnosticar MSC en multíparas, habiendo obtenido un resultado positivo en el análisis de CEL fue de un 56,1%, con valores de 48,4% y 53,6% para las primíparas y el total de la población respectivamente.
- La proporción de vacas con MSC en multíparas, detectadas por CEL fue de 56,1%. En primíparas de un 48,4% y 53,6% en la población total.
- La proporción de vacas con MSC en multíparas, no detectadas por CEL fue de 42,2%. En primíparas de un 55,9% y 46,2% en la población total.

En general la evaluación de CEL como método de diagnóstico para MC y MSC, no muestra grandes diferencias entre las poblaciones de multíparas y primíparas.

IV. Curva de rendimiento diagnóstico (ROC) de la conductividad eléctrica de la secreción láctea para detección diagnóstica de mastitis clínica y subclínica

Finalmente, se realizó la curva de rendimiento diagnóstico (ROC) que estima la eficiencia de una prueba, la cual es una representación gráfica de la sensibilidad frente a [especificidad-1], donde se

interpreta que entre más cerca esté la curva del ángulo izquierdo superior del gráfico, se obtiene un mayor rendimiento diagnóstico, siendo cercano a 1 (Pyörälä, 2003), teniendo en cuenta que las razones de falsos positivos son el eje X y los verdaderos positivos son el eje Y, representando [especificidad-1] y sensibilidad, respectivamente.

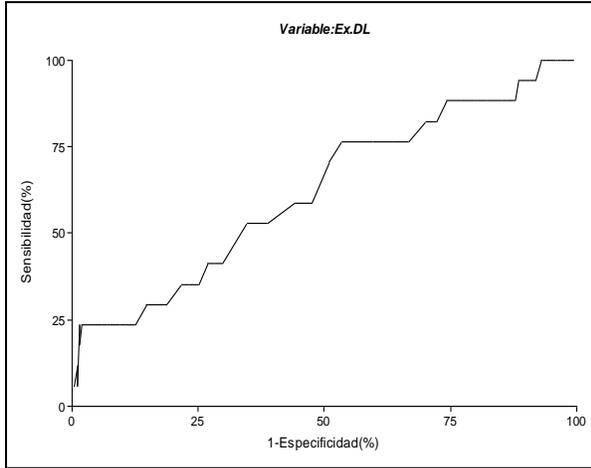
Los resultados de sensibilidad y especificidad determinados en las poblaciones de este estudio, permitieron construir **curvas de rendimiento diagnóstico** para multíparas y primíparas, siendo las pruebas de referencia EDL y CMT, las cuales entregaron un área bajo la curva (ABC) que indicó la eficiencia de la prueba de CEL como método diagnóstico en las distintas poblaciones.

En MC para la población de multíparas ABC fue de 0,62 representando un 62,0% y para primíparas ABC fue de 0,46 representando un 46%. Esto se muestra en las figuras N°3 y N°4, respectivamente.

En MSC para multíparas ABC fue de 0,49 representando un 49,0% y para primíparas fue de 0,57 que indica 57,0%. Esto se representa en las figuras N°5 y N°6, respectivamente.

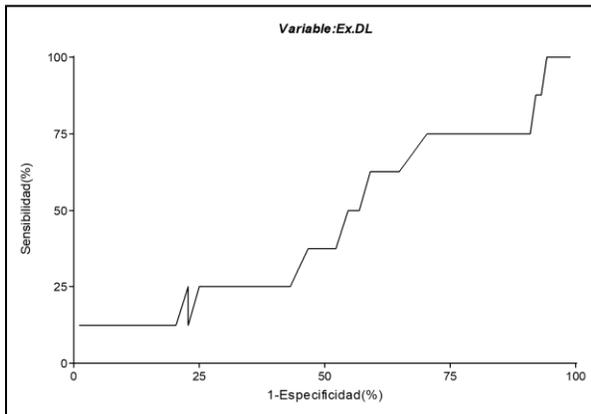
Curvas de ROC de CEL para MC

Figura N°3. Curva de rendimiento diagnóstico para MC en múltiparas



Curva ROC			
Variable: EDL			
Variables de diagnóstico	ABC	E.E.	P
Des. CEL	0,62	0,08	0,05

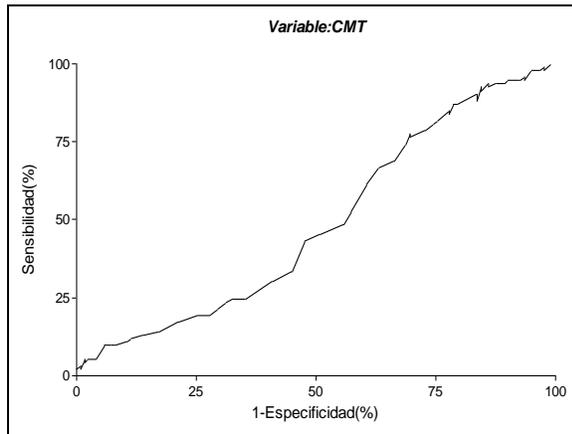
Figura N°4. Curva de rendimiento diagnóstico para MC en primíparas



Curva ROC			
Variable: EDL			
Variables de diagnóstico	ABC	E.E.	P
Des. CEL	0,46	0,10	0,65

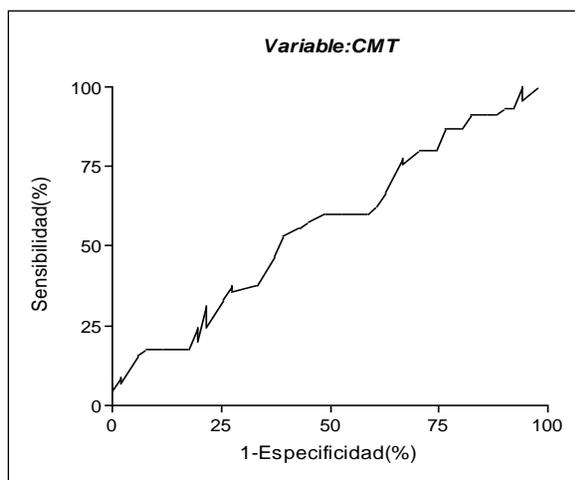
Curvas de ROC de CEL para MSC

Figura N°5. Curva de rendimiento diagnóstico para MSC en múltiparas



Curva ROC			
Variable: CMT			
Variables de diagnóstico	ABC	E.E.	P
Des. CEL	0,49	0,04	0,61

Figura N°6. Curva de rendimiento diagnóstico para MSC en primíparas



Curva ROC			
Variable: CMT			
Variables de diagnóstico	ABC	E.E.	P
Des. CEL	0,57	0,06	0,13

DISCUSIÓN

La comparación de resultados entre CEL y las pruebas consideradas de referencia en este estudio, EDL y CMT, entregan valores muy poco coincidentes. Cabe mencionar que en el caso de MC y MSC, un alto porcentaje de animales son clasificados como positivos para CEL siendo negativos a EDL y CMT, respectivamente. Independientemente de las implicancias epidemiológicas de este resultado, dichas diferencias, en particular los animales positivos que categorizó la prueba de CEL y que fueron considerados negativos por el EDL y CMT, pueden explicarse porque al ser la CEL un método que tiene relación con cambios iónicos que ocurren durante la inflamación, tales como aumento en las concentraciones de sodio y cloruros, cambios de pH y disminución de la grasa láctea, estos cambios también pueden ser causados por factores que no tienen relación con la inflamación de la glándula mamaria, como raza, etapa de la lactancia, edad del animal, volumen de producción láctea o el número ordinal de parto (Pyörälä, 2003), y quizás otros no suficientemente estudiados como procesos inflamatorios asociados a otros órganos, episodios de enfermedades sistémicas, alteraciones digestivas, cambio de ración o ciclo estral entre otros.

Se han utilizado diferentes criterios para asociar los valores de CEL al estado sanitario de la glándula mamaria (Norberg, 2003, citado por Mansor, 2012), entre éstos la relación de CEL entre cuartos, los valores máximos y mínimos de CEL, el valor máximo de CEL por vaca, variaciones máximas y mínimas de la CEL por cuartos y la máxima variación de CEL para una vaca en cada ordeña durante una lactancia. De todos estos criterios de diagnóstico, **la relación de CEL entre cuartos** entregó los mejores resultados en la clasificación correcta de vacas con mastitis para MC (80,6%), MSC (45,0%) y para hembras sanas (74,8%). Concluyendo que CEL sería un buen indicador de mastitis. (Bansal *et al.*, 2005); (Mansor, 2012). Lo anterior explicaría los bajos resultados en las tablas de contingencia de este estudio que fue realizado con valores absolutos de la CEL, entregando resultados para MC (5,8%), MSC (33,4%) y hembras sanas (51,8%).

Casi intuitivamente debería asumirse que un valor de CEL elevado debería corresponder a cuadros de inflamación de la glándula mamaria. Sin embargo, algunos autores han planteado lo inadecuado de este criterio basado en lo citado previamente, incluso considerando diferencias individuales

entre vacas y/o cuartos, propios de cada individuo u órgano, asociado a diferencias fisiológicas o ambientales que puedan influir sobre los cambios iónicos de la secreción láctea.

Investigaciones posteriores han propuesto considerar variaciones secuenciales de la CEL para determinar la presencia de infecciones intramamarias, entre ellas el concepto de variación máxima. También se ha propuesto utilizar **los valores máximos de las variaciones de la CEL** para describir el estado de salud de la glándula mamaria en forma más precisa que los valores absolutos de CEL (Ilie, *et al.*, 2010), en otros términos se propone considerar como indicativo de infección intramamaria las variaciones extremas de intensidad de los cambios iónicos en la leche, en función de la etapa de lactancia donde ocurra. Otros autores han planteado como metodología de análisis considerar variaciones de la CEL a partir de un rango definido y/o con una intensidad determinada, opción que se consideró en este estudio, con diferentes criterios de clasificación o análisis como número de partos y días en leche.

Además el presente estudio demostraría que los resultados de CEL no están asociados significativamente con las pruebas de referencia, lo que podría deberse a que Afimilk® realiza mediciones por vaca, y no por cuartos, factor que ya se ha señalado anteriormente y que también es mencionado en otros estudios que destacan que la observación por cuarto es más eficiente que la individual, mejorando así la detección de MC y MSC (Biggadike *et al.*, 2000; Hillerton, 2000; Davis *et al.*, 2003). Por otra parte, la variabilidad en la CEL podría estar afectada por eventos inflamatorios, o de otro origen no necesariamente específicos de la glándula mamaria, en consideración a esto diversos autores han propuesto utilizar como estimador de mastitis las variaciones de la CEL entre cuartos. Cabe consignar que en este estudio la muestra utilizada para medir la CEL fue compuesta, es decir, contenía leche de cada cuarto de cada vaca y no individualmente por cuarto.

De lo mencionado en el párrafo anterior, se puede mencionar que los resultados obtenidos con la prueba de Chi-cuadrado, indicarían que la CEL no es un examen eficiente para el diagnóstico de MC y MSC. Sin embargo, otros estudios la señalan como un buen indicador del estado clínico, detectando todos los casos de MC (>500.000 cs/ml y con la bacteriología positiva), pero sólo el 50% de los casos subclínicos (> 200.000 cs/ml), por lo que, la CEL sería una prueba de menor eficiencia en el diagnóstico de MSC (Pyörälä, 2003), que podría coincidir con este estudio donde

se observó que para la población de multíparas con MC se logró los mejores resultados diagnósticos siendo de una eficiencia moderada.

En algunos estudios se demostró que los valores absolutos de la CEL fueron ineficientes para discriminar infecciones intramamarias, considerando la variación de la CEL. Si bien esos estudios contemplaron la medición de la CEL, por cuarto mamario, obtuvieron respuestas discriminatorias significativas ($p < 0,05$), que pueden calificarse desde regulares a moderadas, en función del criterio de selección de caso que se utilice (Biggadike *et al.*, 2002).

Otro punto importante, es que los resultados encontrados en este estudio entregaron valores de sensibilidad y especificidad bajos en multíparas, primíparas y población total, al igual que las curvas de rendimiento diagnóstico donde los valores de ABC fueron bajos. Esto pone en evidencia lo poco efectivo de la metodología propuesta para el diagnóstico de mastitis (MC y MSC) asociado a los métodos clásicos de diagnóstico. Estos resultados podrían asociarse a los antecedentes previamente mencionados, el mal desempeño de la prueba de CEL como metodología diagnóstica en este estudio, se encuentra probablemente asociado a rangos inadecuadamente establecidos para descartar o incluir animales en las pruebas confirmatorias.

Es de relevancia recordar que este estudio compara la prueba de CEL para la detección de MC o MSC, con respecto a dos pruebas clásicas de campo utilizadas como pruebas de referencia. Otros estudios han utilizado la identificación de patógenos involucrados en los cuadros de mastitis (patógenos mayores y/o menores), asociando estos resultados a la eficiencia de CEL; escenario en que la sensibilidad y especificidad de la prueba resultó confiable respecto a infecciones por patógenos mayores (Ruegg, 2003). Lo anterior sugiere, para estudios futuros, considerar aspectos bacteriológicos en el diagnóstico de mastitis que permitirían mejorar la interpretación de los resultados entregados por CEL, además incluir valores de RCS superiores a 500.000 cs/ml (Elizalde, *et al.*, 2009) que lograrían valores de sensibilidad y especificidad más altos en la prueba de la CEL.

Es fundamental la detección temprana en el caso del diagnóstico de MSC con el fin de entregar una producción de leche de buena calidad, disminuyendo así las pérdidas económicas asociadas a

MSC. La prueba de la CEL podría considerarse un sistema de alerta temprana en la detección de alzas de las concentraciones de iones de sodio y cloruro como consecuencia de la inflamación de la ubre. Sin embargo, como indicador de MSC, debe ser utilizado en conjunto con otros métodos para que sea confiable su interpretación (Kasikci, *et al.*, 2012), lo que queda evidenciado en la figura N°2. Por otra parte cuando se utiliza la CEL como diagnóstico de infección intramamaria, se debe considerar la fracción del flujo de leche que es analizada, ya que la mayor sensibilidad diagnóstica se logra mediante el uso de las primeras fracciones del flujo de leche. (Woolford, 1998; Biggadike *et al.*, 2002; Mansell y Seguya, 2003; Mansor, 2012).

Los puntos de corte de CEL utilizados en la población de este estudio variaron entre 6,0 a 10, 0 mS/cm, que coinciden con estudios que proponen un valor de corte $>5,0$ mS/cm, en consecuencia, cabría esperar que la sensibilidad y especificidad serían similares, aumentando los valores de punto de corte (Elizalde, *et al.*, 2009), en consecuencia más que modificar los puntos de corte de las poblaciones en estudio, debe tenerse en cuenta que las variaciones máximas de CEL y la medición por cuartos son importantes para mejorar los valores en la sensibilidad y especificidad.

En este estudio, para MC el valor de sensibilidad fue de un 76,5% para la población de multíparas siendo el mejor resultado entregado por CEL, lo que coincide con otro estudio que indica que CEL sería un buen método para el diagnóstico temprano de MC, determinando un bajo porcentaje de falsos negativos (Claycomb *et al.*, 2009), siendo esto importante en el caso de instaurar terapias en forma temprana en hembras con MC. En el caso de MSC, CEL no sería suficientemente sensible para su detección, por lo que debería apoyarse en otros métodos (Davis *et al.*, (2003).

Las curvas de ROC indicarían que la prueba de CEL no fue eficiente en categorizar hembras con MC o MSC, obteniéndose la mayor exactitud de la prueba en la población de multíparas con MC, donde el ABC fue 0,62, lo que significa que existe un 62% de probabilidad de que una hembra diagnosticada por CEL con MC tenga MC. A pesar de esto, el ABC lograda en multíparas con MC califica a CEL de regular en la detección del cuadro. Esto se puede explicar porque este estudio seleccionó hembras con valores absolutos de CEL y muestras compuestas de leche por vaca. Otros estudios sugieren que los mejores resultados, medidos en función del área bajo la curva de ROC, se obtienen con mediciones de los rangos máximos de variaciones de CEL y cuando el criterio diagnóstico de infecciones intramamarias incluye cultivos bacterianos y utilizando muestras con

RCS superior a las 500.000 cs/ml de leche, en estos casos se han obtenido valores de área bajo la curva ROC de 0,82 y niveles estimados de sensibilidad de 78% y especificidad de 79,1% para la prueba de la CEL (Elizalde, *et al.*, 2009).

Varios autores plantean que para mejorar la prueba de CEL como método diagnóstico, se debería lograr una mejor sensibilidad y especificidad, situación que tiene relación con los umbrales de CEL. De esta manera se obtienen valores intermedios entre el valor medido y el valor estimado, logrando una curva de rendimiento cercano a uno, con un bajo número de falsos positivos (Hillerton, 2000; Cavero, 2006).

En resumen, la prueba de CEL (sistema Afimilk) utilizada en este estudio entregó valores absolutos de CEL de la mezcla de leche de los cuatro cuartos, siendo relevante este punto debido a que un número importante de autores mencionan que estos criterios entregan bajos valores de sensibilidad y de especificidad en la prueba, proporcionando resultados poco fiables para el diagnóstico de mastitis y en el control de la glándula mamaria. Por lo tanto, se puede establecer que además de los factores intrínsecos y extrínsecos del animal asociado a las variaciones iónicas de la leche que pudieron influir en la entrega de resultados poco eficientes de la CEL en diagnosticar vacas con mastitis, los dos factores mencionados anteriormente (medición por vaca, valor absoluto de la CEL) para varios autores son altamente relevantes al momento de categorizar la prueba de la CEL como método único de diagnóstico, no obstante, cumple un rol relevante en el plantel lechero como método poblacional en el control de mastitis apoyado con pruebas de terreno simples y de bajo costo como examen directo de leche y California mastitis test.

CONCLUSIONES

- ✓ CEL no es un predictor eficiente para el diagnóstico de MC y presenta una baja asociación entre los métodos diagnósticos siendo no significativa estadísticamente, en consecuencia CEL no es buen método diagnóstico de MC.

- ✓ CEL no es un predictor eficiente para el diagnóstico de MSC y presenta una baja asociación entre los métodos diagnósticos siendo no significativa estadísticamente, en consecuencia la CEL no es buen método diagnóstico de MSC.

- ✓ CEL como método diagnóstico en mastitis (MC y MSC), logró bajos valores de sensibilidad y especificidad.

- ✓ Las curvas de rendimiento diagnóstico indicaron que CEL no debe ser un método de única elección para categorizar animales sanos o enfermos por su bajo rendimiento diagnóstico

ANEXO

Tabla N°9. Interpretación del examen CMT por vaca según los grados observados en las muestras

Grados CMT	Tipo de reacción	Recuento células somáticas (Cs/ml)	Categoría según CMT por vaca
Negativo	Mezcla se mantiene Líquida, no hay reacción.	0-200.000	Negativa
Traza	Existe una ligera reacción que al movimiento de la paleta desaparece.	150.000-500.000	Negativa
1	Se distingue la reacción y se mantiene la reacción al movimiento de la paleta.	400.000-1.500.000	Positiva
2	Existe un aumento en la viscosidad, la muestra se espesa y tiende a ir hacia el centro.	800.000-5.000.000	Positiva
3	Forma un gel y la superficie de la muestra forma una forma convexa.	>5.000.000	Positiva ⁸

(Basado en Schalm, 1977).

BIBLIOGRAFÍA

- BANSAL, B; HAMANN, J; GRABOWSKI, N; SINGH, K.** 2005. Variation in the composition of selected milk fraction samples from healthy and mastitic quarters, and its significance for mastitis diagnosis. *J. Dairy Res.* 72: 144-152.

- BEDOLLA, C; CASTAÑEDA, V; WOLTER, W.** 2007. Métodos de detección de mastitis bovina. *México* 68: 4-5. [en línea].
<http://www.erevistas.csic.es/ficha_articulo.php?url=oai:www.veterinaria.org/revistas/redvet:10325&oai_iden=oai_revista68> [consulta: 02-02-2008].

- BIGGADIKE, H; OHNSTAD D; HILLERTON J.** 2000. Practical evaluation of milk conductivity measurements. In: *Proceedings British Mastitis Conference*. Shepton Mallet. p 56-61.

- BIGGADIKE, H; OHNSTAD, D; LAVEN, R.; HILLERTON, J.** 2002. Evaluation of measurements of the conductivity of quarter milk samples for the early diagnosis of mastitis. *Vet. Rec.* 150: 655-658.

- BLOOD, D; RADOSTITS, O; ARUNDEL, J; GAY, C.** 1992. Mastitis. Eds: *Medicina Veterinarias. Libro de texto enfermedades del ganado vacuno, ovino, porcino, caprino y equino.* 7ª ed. DF. México. p. 539.

- BUTLER, J.** 1986. Biochemistry and biology of ruminant immunoglobulins. *Progress in Veterinary Microbiology and Immunology.* 2:1-53.

- CAVERO, D.** 2006. Automated mastitis detection in dairy cows using different statistical methods. Analysing serial data for mastitis detection by means of local regression. *Institute of Animal Breeding and Husbandry* . Christian Albrechts University. p 17-20.

•**CLAYCOMB, R; JOHNSTONE, P; MEIN, G; SHERLOCK, R.** 2009. An automated in-line clinical mastitis detection system using measurement of conductivity from foremilk of individual udder quarters. *New Zea. Vet. J.* 57: 208-214.

•**COBERLLINI, C.** 1998. Mecanismos de defensa de la glándula mamaria bovina. In: Meglia, G; Mata, H. 2001. Mecanismos de defensa específicos e inespecíficos, con referencia a la glándula mamaria de los bovinos productores de leche. Argentina. p 31. [en línea].

<http://www.produccionbovina.com/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_leche/10-Inmunidad_en_glandula_mamaria.pdf> [consulta: 02-02-2008].

•**DAVIS, R; PROSSER, C; NICHOLAS, G; LEE, J; HART, A; FARR, V.** 2003. Mastitis detection method. *European.* [en línea].

<<http://www.freepatentsonline.com/EP1192460B1.pdf>> [consulta: 20-11-2012].

•**ELIZALDE, E; SIGNORINI, M; CANAVESIO, V; CUATRIN, A; TARABLA, H; CALVHINO, L.** 2009. Medición de la conductividad eléctrica en leche como método diagnóstico de mastitis subclínica bovina. *Fave, Revista Veterinaria* 8 (1). P 16-28.

•**HILLERTON, E.** 2000. Detection mastitis cow side. In: *National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings.* p 48-53.

•**ILIE, L; TUDOR; ANCA MARIA GALIS.** 2010. The electrical conductivity of cattle milk and the possibility of mastitis diagnosis in Romania. In: *Medicina Veterinaria* vol. XLIII (2), Timisoara. p 220-227.

•**KASIKCI, G; CETIN O; BINGOL E; GUNDUZ M.** 2012. Relations between electrical conductivity, somatic cell count, California Mastitis Test and some quality parameters in the diagnosis of subclinical mastitis in dairy cows. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 2012; 36: 49-55. [en línea].

<<http://journals.tubitak.gov.tr/veterinary/issues/vet-12-36-1/vet-36-1-8-1103-4.pdf>> [consulta: 22-10-2012].

- KING, J** 1981. Streptococcus uberis: A review of its role as a causative organism of bovine mastitis.II. Control of infection. Br. Vet. J. 137: 160–165.

- KITCHEN, B; MIDDLETON, G; DURWARD I; ANDREWS R; SALMON M.** 1980. Mastitis diagnostic test to estimate mammary gland epithelial cell damage. J. Dairy Sci. 63: 978-983.

- KITCHEN, B.** 1981. Review of the progress of dairy science: bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic test. J. Dairy Res. 48: 167-188.

- LAKE, J.** 1992. Trials of a novel mastitis sensor on experimentally infected cows. J. Dairy Res. 59: 11-9.

- LANSBERGEN, L.** 1994. Evaluation of prototype on-line electrical conductivity system for detection of subclinical mastitis. J. Dairy Sci. 77: 1132-1140.

- MAATJE, K.** 1992. The efficiency of on-line measurement of quarter milk electrical conductivity, milk yield and milk-temperature for the detection of clinical and subclinical mastitis. Livest. Prod. Sci. 30: 239-249.

- MANSELL, PD; SEGUYA, A.** 2003. The use of hand held conductivity meter for the diagnosis of subclinical mastitis in dairy cows during late lactation. New Zea. Vet. J. 51: 21-25.

- MANSOR, R.** 2012. Proteomic and matabolomic studies on milk during bovine mastitis. PhD thesis. University of Glasgow.p 44. [en línea].
<<http://these.gla.ac.uk/3207/>> [consulta: 05-01-2013].

- MOLINA, G.** 1988. Empleo de lauril sulfato de sodio en el diagnóstico de mastitis subclínica del bovino. Relación con recuento de células somáticas en leche. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. p 58.

- MUHAMMAD, S; NAVEED, S; ISHTIAQ; MUHAMMAD, I; MUHAMMAD; SAJJAD, A.** 2011. Diagnosis of subclinical mastitis in bovine using conventional methods and electronic detector. *J. of Agr. and Bio. Sci.* p 18-22.

- MUSSER, J; ANDERSON, K; CABALLERO, M; AMAYA, D; MAROTOPUGA, J.** 1998. Evaluation of a hand-held electrical conductivity meter for detection of subclinical mastitis in cattle. *Am. J. of Vet. Res.* 59: 1087-1091.

- NIELEN, M.** 1992. Electrical conductivity of milk: measurement, modifiers, and meta analysis of mastitis detection performance. *J. Dai. Sci.* 75: 606-614.

- NIELEN, M.** 1995. Detection of subclinical mastitis from on-line milking parlor data. *J. Dai. Sci.* 78: 1050-1061.

- NMC.** 1996. Current concept of bovine mastitis. 4th edition. 1: 1-11

- NORBERG, E; HOGVEEN, H; KORSGAARD, I; FRIGGENS, N; SLOTH, K; LOVENDAHL, P.** 2004. Electrical conductivity of milk: Ability to predict mastitis status. *J. Dai. Sci.* 78: 1039-1049.

- NORCROSS, N.** 1991. Specific defence mechanisms of the udder. *Vet. J.* 62: 129-139.

- PEREZ, M; COYA, M; VEGA, R; ORTEGA, R.** 2008. Mastitis en vaca un diagnóstico complejo. Universidad de Oviedo, Asturias. p. 3. [en línea].
<<http://www.scribd.com/doc/7862416/18-Mastitis-en-Vacas>> [consulta: 15-05-2009].

- PHILPOT, W.** 1999. Aumento de la rentabilidad mediante el mejoramiento de de la calidad de leche y la reducción de la mastitis. Curso de Perfeccionamiento y Mejoramiento de la Calidad Higiénica de la Leche de Pequeños Productores. Osorno, Chile. 1999. Universidad de Chile. Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. p 49-84.

- PHILPOT, N; NICKERSON, S.** 2000. Desarrollo de la mastitis. Mecanismos de defensa contra la mastitis. Eds: Ganando la lucha contra la mastitis. Westfalia-Surge. Naperville, Estados Unidos. p 14-37.

- PYÖRÄLÄ, S.** 2003. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. Vet. Res. 34: 564-578.

- ROSENBERGER, G.** 1994. Ubre. Clasificación clínica de las inflamaciones de la ubre. In: Exploración clínica de los bovinos. 3ª ed. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina. p 508.

- RUEGG, P.** 2002. Milk quality and mastitis test. University of Wisconsin, Madison. p 10-12. [en línea].
<<http://www.vet.cmu.ac.th/Branch/Web%20Department/CK/mastitis/milk%20quality/milk%20quality%20and%20mast.pdf>> [consulta: 10-08-2006].

- RUEGG, P.** 2003. Manejo hacia la calidad de la leche. University of Wisconsin, Madison. p 2-3. [en línea].
<<http://www.cigal.biz/ponencias/calidadmanejo.pdf> > [consulta: 04-02-2008].

- SANDHOLM, M; KORHONEN, H.** 1995. Mastitis. Infections of the udder inflammation antibacterial defence mechanisms of the udder. Eds: Sandholm, M; Honkanen-Bulzalski, T; Kaartinen L; Pyörälä, S. The bovine udder and mastitis. University of Helsinki. Faculty of Veterinary Medicine Helsinki. Printed in Finland by Gummerus Kirjapaino Oy, Jyväskylä. p 37.

- SCHALM, O.** 1977. Changes in composition in mastitis. Eds: A syllabus on the bovine mammary glands in health and disease. University of California, Davis. USA. p 25-26.

- SMITH, K; OLIVER, S.** 1981. Lactoferrin: A component of nonspecific defense of the involuting bovine mammary gland. Adv. Exp. Med. Biol. 137: 535-554.

- SORDILLO, L; NICKERSON, S; AKERS, R; OLIVER, S.** 1987. Secretion composition during bovine mammary involution and the relationship with mastitis. *Int. J. Biochem.* 19: 1165-1172.

- SPAKAUSKAS, V; KLIMIENE, I.** 2006. A compararison of indirect methods for diagnosis of subclinical mastitis in lactating dairy cows. *Vet Arc.* 76: 101-109.

- TINSKY, M.** 1995. Early detection of clinical and sub-clinical mastitis using an on-line electrical conductivity device in the parlor. In: *Proceedings of the third IDF International Mastitis Seminar.* Beit-Dagan, Israel. 28 de mayo - 1 de junio 1995 The National Mastitis Reference Center. Kimrom Veterinary Institute. p 13.

- TIZARD, I.** 1996. *Veterinary immunology: an introduction.* 5ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia, USA. Eds: Meglia, G; Mata, H. 2001. Mecanismos de defensa específicos e inespecíficos, con referencia a la glándula mamaria de los bovinos productores de leche. Argentina. p 34. [en línea].
<http://www.produccionbovina.com/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_leche/10-Inmunidad_en_glandula_mamaria.pdf> [consulta: 02-02-2008]

- WOLTER, W; KLOPPER, B.** 2004. Interpretación de los resultados del conteo celular y la aplicación de la terapia. Eds: *Avances en el diagnóstico y control de la mastitis bovina.* Guadalajara, Jalisco, México. p. 5.

- WOOLFORD, M. W; WILLIAMSON, J. H; HERDERSON, H. V.** 1998. Changes in electrical conductivity and somatic cell count between milk fractions from quarters subclinically infected with particular mastitis pathogens. *J. Dairy Res.* 65: 187-198.

- ZECCONI, A; SMITH, K.L.** 2000. Ruminant Mammary Gland Immunity. In: *Symposium on innmunology of ruminant mammary gland.* 11-14 june. 2000. Italy. p. 31-36.