



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

MÉTODOS DE DETECCIÓN DE LA MASTITIS BOVINA

SERVICIO PROFESIONAL QUE PRESENTA
MARLON DELGADO LÓPEZ

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Asesor: MC. José Luis Carlos Bedolla Cedeño

Morelia, Michoacán, Diciembre 2005.



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

MÉTODOS DE DETECCIÓN DE LA MASTITIS BOVINA

SERVICIO PROFESIONAL QUE PRESENTA
MARLON DELGADO LÓPEZ

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Morelia, Michoacán, Diciembre 2005.

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

A mi madre: por darme su amor, apoyo, comprensión en los momentos difíciles y también por compartir mis preocupaciones, temores, deseos y ansiedades conmigo hasta alcanzar mi meta propuesta hasta ahora.

A mi abuelita: por entregarse completamente en los momentos más esenciales de mi formación y su incondicional apoyo y esfuerzo.

A mi hermano: por ser parte de mi familia y por ser también un gran amigo en quien adopte de él sus consejos y alientos.

A mis tíos: por sus consejos y ejemplos como personas.

A mis primos: por su motivación y sus alientos.

A mis amigos: por acompañarme durante todo momento en mis alegrías, ansiedades y tristezas. Gracias por su apoyo brindado.

A Dios: por darme el derecho a la vida, por la salud, por brindarme serenidad y paciencia en los retos de mi vida.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia dependiente de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo: por albergarme en sus aulas y darme el conocimiento que en mi formación se requiere.

A la UMSNH: por ser el pilar de mi formación.

A mi asesor: por su ardua motivación, desempeño, ejemplo en su forma de trabajar y su amistad muchas gracias.

A la coordinación de la investigación científica de la Universidad Michoacana por el apoyo otorgado al proyecto 14.10, del cual forma parte este trabajo.

El presente trabajo forma parte del proyecto 14.10 " Identificación y tipificación molecular de *Staphylococcus aureus* aislado de vacas con mastitis del municipio de Tarimbaro, Michoacán" el cual es financiado por la coordinación de la investigación científica de la Universidad Michoacana dentro del programa Marzo 2005 a Febrero del 2006.

ÍNDICE

	Pág.
I.- INTRODUCCIÓN	1
II.- REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1.- MASTITIS	3
2.2.- MÉTODOS DE DETECCIÓN DE LA MASTITIS BOVINA	4
2.2.1.- Observación y palpación de la ubre	4
2.2.2.- PRUEBAS FÍSICAS	5
2.2.2.1.- Prueba de la escudilla de ordeño	5
2.2.2.2.- Prueba del paño negro	6
2.2.2.3.- Taza probadora	6
2.2.3.- PRUEBAS QUÍMICAS	7
2.2.3.1.- Conductividad eléctrica de la leche	7
2.2.3.2.- Papel indicador de mastitis	10
2.2.3.3.- Prueba de whiteside	10
2.2.4.- PRUEBAS BIOLÓGICAS	12

2.2.4.1.- Prueba de California para Mastitis (CMT)	12
2.2.4.2.- Prueba de Wisconsin para Mastitis (WMT)	16
2.2.4.3.- Monitoreo del conteo de células somáticas	19
2.2.4.4.- Pruebas bacteriológicas	21
2.2.4.5.- Conteo de células somáticas por microscopia directa	22
2.2.5.- MÉTODOS DE CONTEO ELECTRÓNICO CELULAR	23
2.2.5.1.- Método bactoscan	24
2.2.5.2.-Método fluoro-opto-electrónico (Fossomatic) y Counter Coulter	24
III.- CONCLUSIONES	28
IV.- REFERENCIAS	29

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Interpretación de resultados de la prueba de Whiteside	11
Cuadro 2. Interpretación de resultados de la Prueba de California para Mastitis	16
Cuadro 3. Interpretación de resultados para prueba de Wisconsin	17

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Prueba de la escudilla de ordeño	5
Figura 2. Prueba del paño negro	6
Figura 3. Taza Probadora	7
Figura 4. Aparato para determinación de la Conductividad eléctrica de la leche	9
Figura 5. Papel indicador de mastitis	10
Figura 6. Prueba de whiteside	11
Figura 7. Prueba de California despunte	13

Figura 8. Prueba de California utilización de la paleta	13
Figura 9. Prueba de California volumen de reactivo en leche	13
Figura 10. Prueba de California examen de la muestra	13
Figura 11. Interpretación de los resultados de la Prueba de California	15
Figura 12. Procedimiento de la prueba de Wisconsin WMT para el diagnóstico de la mastitis subclínica	17
Figura 13. Procedimiento de siembra, incubación e identificación	21
Figura 14. Procedimiento de microscopia directa	22
Figura 15. Aparato Counter Coulter	25
Figura 16. Método fluoro-opto-electrónico (Fossomatic)	26

I.- INTRODUCCIÓN

En el presente trabajo se hace referencia a los principales métodos de detección de la mastitis bovina, los cuales resultan ser de gran importancia para diagnosticar este problema que es muy frecuente en el ganado productor de leche y que ocasiona grandes pérdidas económicas a los productores en todo el mundo.

El documento esta estructurado de la siguiente manera: primero, se aborda lo referente a lo que es la mastitis y las formas como ésta se presenta en el ganado.

Enseguida, se describe el primer método que es el de la observación y palpación de la ubre, posteriormente las pruebas físicas que dentro de estas están la prueba de escudilla de ordeño, prueba de paño negro y taza probadora las cuales se encargan de diagnosticar mastitis clínicas, las siguientes pruebas son las químicas como la prueba de conductividad eléctrica de la leche, papel indicador de mastitis y prueba de whiteside que sirven también para diagnosticar mastitis clínicas y subclínicas, las pruebas biológicas son la prueba de California para mastitis (CMT), la prueba de Wisconsin para mastitis (WMT), el monitoreo de células somáticas, así como el diagnóstico bacteriológico por los métodos de aislamiento, cultivo, tinción, bioquímica e identificación y por último el conteo de células somáticas por microscopia directa.

Finalmente, se hace referencia a los métodos de conteo electrónico celular como el Bactoscan, Fossomatic y el Counter Coulter.

La metodología utilizada consistió en la búsqueda, obtención, detección, consulta, extracción y síntesis de información sobre el tema objeto de estudio.

El objetivo del trabajo fue describir cada uno de los métodos de detección de la mastitis bovina que se utilizan con mayor frecuencia en el mundo.

II.- REVISIÓN DE LITERATURA

2.1.- MASTITIS

La mastitis, es la respuesta inflamatoria de la glándula mamaria normalmente causada por bacterias (Kerr y Wellnitz, 2003; Bannerman *et al.*, 2004; Hansen *et al.*, 2004; Hillerton y Berry, 2005). Es probablemente la más costosa de las enfermedades infecciosas, endémicas que afecta a las vacas y otras especies lecheras. Su impacto es en la producción animal, bienestar animal y la calidad de la leche producida (Hillerton y Berry, 2005).

Se caracteriza por la entrada de células somáticas, principalmente neutrofilos polimorfonucleares (PMN), en la glándula mamaria y por un aumento en el contenido de proteasa en la leche (Kerr y Wellnitz, 2003).

La mastitis, es reconocida comúnmente por los signos clínicos, y más obviamente por las anomalías en la leche y la ubre (Hillerton y Berry, 2005). Los síntomas clínicos incluyen una disminución en la producción de leche, aumento en el número de leucocitos, composición y apariencia alterada (grumos) de la leche, fiebre, cuartos mamarios enrojecidos, hinchados y calientes.

Las vacas con mastitis subclínica no muestran ninguna señal obvia de la enfermedad (Kerr y Wellnitz, 2003), y a menudo presentan una disminución en la producción, un conteo elevado de leucocitos y un aumento en el contenido de bacterias en la leche (Hansen *et al.*, 2004; Hillerton y Berry, 2005).

2.2.- MÉTODOS DE DETECCIÓN DE LA MASTITIS BOVINA

2.2.1.- Observación y palpación de la ubre

En la mastitis subclínica, la ubre de la vaca permanece aparentemente sana, la leche que produce, a simple vista, es una leche normal, pero una infección incipiente puede estar dañando el tejido glandular y provocando por lo tanto una alteración en la leche que esta produce (Pérez *et al.*, 2005).

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 (Pérez *et al.*, 2005).

Cuando se encuentran 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 *et al.*, 2005).

2.2.2.- PRUEBAS FÍSICAS

Estas sólo son útiles cuando la mastitis ya esta 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 *et al.*, 2005).

2.2.2.1.- 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 (Figura 1) (Charles, 1984).



Figura 1. Prueba de la escudilla de ordeño

2.2.2.2.- Prueba del paño negro

Esta se realiza durante la preparación de la vaca para la ordeña. 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 (Figura 2). 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, 1986).



Figura 2. Prueba del paño negro

2.2.2.3.- Taza probadora

Examine los primeros chorros de leche de cada ordeño sobre un recipiente (strip cup) de fondo oscuro (Figura 3). 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, 2001).



Figura 3. Taza probadora

2.2.3.- 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 CE, el procedimiento químico es muy variable y hasta cierto punto subjetivo por lo que no es recomendable como prueba única (Pérez *et al.*, 2005).

2.2.3.1.- Conductividad eléctrica de la leche

La Prueba de Conductividad Eléctrica (PCE) 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 y Montaldo, 2003; Norger *et al.*, 2004).

Se le encuentra como parte de algunos equipos de ordeño computarizados dentro de las salas de ordeño así como también en forma de medidores portátiles, lo que permite el monitoreo individual por cuarto (Medina y Montaldo, 2003; Norger *et al.*, 2004).

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 autoanalizadores (Radostits, 2002).

Se puede emplear una combinación de la detección de mastitis subclínica tomando como base la conductividad eléctrica de la leche, la producción láctea, el número de parto y los días de lactación, como un modelo logístico de regresión como instrumento de análisis en un rebaño con una incidencia alta de mastitis subclínica (Radostits, 2002).

El aparato disponible que se promociona con más frecuencia, basado en la medición de la conductividad eléctrica de la leche, es un dispositivo que se sostiene con la mano y tiene una copa empotrada donde se lanzan los chorros de la leche (Figura 4) (Radostits, 2002).



Figura 4. Aparato para determinación de la conductividad eléctrica de la leche

Permite la identificación de la mastitis clínica con precisión, pero en el caso de las mastitis subclínicas, la precisión es solo del 50% en comparación con los métodos estándar (Radostits, 2002).

Este instrumento proporciona una lectura digital del resultado de la PCE y representa una alternativa a la Prueba de California para Mastitis (CMT) como prueba de monitoreo de la mastitis subclínica al lado de la vaca (Medina y Montaldo, 2003). Aunque a veces da como resultado un gran número de falsos positivos o de falsos negativos, por lo que no es muy confiable (Wolter *et al.*, 2004).

Este sistema permite controlar las nuevas infecciones intramamarias en los cuarterones de forma continua en cada ordeño. Todavía queda mucho que aprender sobre la interpretación y utilización de estos datos automatizados de la EC de la leche (Radostits *et al.*, 2002).

2.2.3.2.- 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 (Figura 5). La prueba descubre el 50% de las leches infectadas (Charles, 1984).

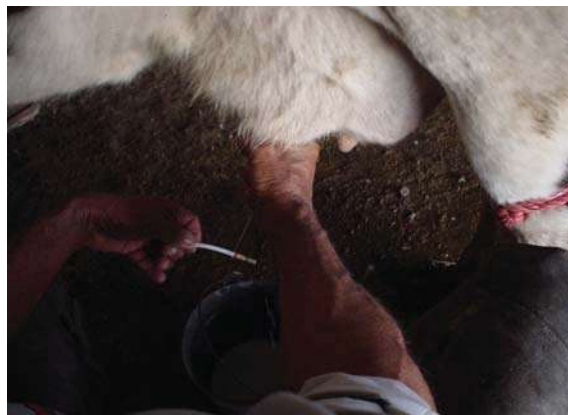


Figura 5. Papel indicador de mastitis

2.2.3.3.- 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 (Figura 6) (Ávila, 1984; Pérez, 1986).

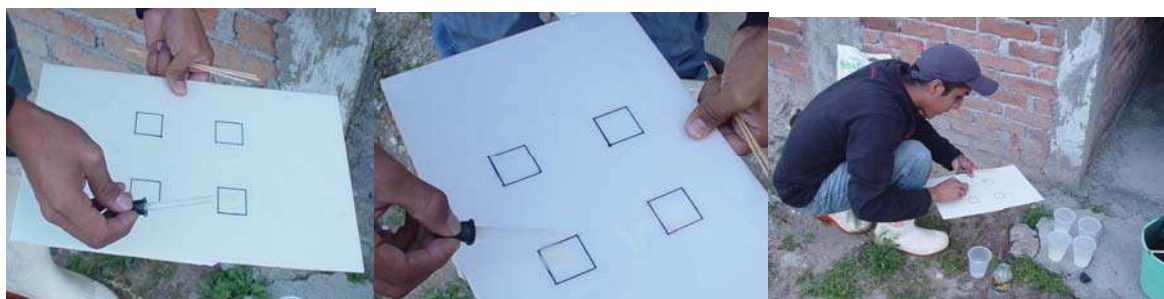


Figura 6. Procedimiento de la prueba de whiteside

Procedimiento:

- Colocar 5 gotas de leche fría en el centro del cuadrado y agregar 2 gotas de la solución de NaOH al 4%.
- Mezclar vigorosamente, dispersando la leche en el cuadrado por medio de un palillo. Continuar mezclando por alrededor de 20 segundos y dar lectura al resultado.
- Interpretar de acuerdo al siguiente Cuadro 1:

Cuadro 1. Interpretación de resultados de la prueba de Whiteside

mm de leche	Células somáticas / ml
Negativo	0 - 325,000
Traza	300,000 – 600,000
1 +	600,000 – 1, 000,000
2 +	1, 000,000 - 2, 000,000
3 +	más de 2, 000,000

Fuente: Pérez, 1986.

2.2.4.- PRUEBAS BIOLÓGICAS

Dentro de éstas se encuentran: la prueba de California para mastitis, 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 *et al.*, 2005).

2.2.4.1.- Prueba de California para Mastitis (CMT)

La Prueba de California para Mastitis (CMT, por sus siglas en inglés) 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 (Morresey, 1999; Radostits, 2000; Medina y Montaldo, 2003; Erskine, 2001; Bedolla, 2004).

Es una prueba sencilla que es útil para detectar la mastitis subclínica por valorar groseramente el recuento de células de la leche. 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).

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

1. Se desecha la leche del preordeño (Figura 7).

2. Se ordeñan uno o dos chorros de leche de cada cuarto en cada una de las placas de la paleta (Figura 8).
3. Se inclina la paleta de modo que se deseche la mayor parte de esta leche.
4. Se añade a la leche un volumen igual de reactivo (Figura 9).
5. Se mezcla el reactivo y se examina en cuanto a la presencia de una reacción de gelificación (Figura 10). Antes de continuar con la vaca siguiente se debe enjuagar la placa.



Figura 7. Despunte



Figura 8. Utilización de la paleta



Figura 9. Volumen de reactivo en la leche



Figura 10. Examen de la muestra

Los resultados pueden ser interpretados en cinco clases (Figura 11): desde el resultado negativo en el que la leche y el reactivo siguen siendo acuosos, hasta el recuento de células más elevado en el que la mezcla de la leche y el reactivo casi se

solidifica. Esto se determina en relación a la reacción de gelificación (Cuadro 2) (Pérez, 1986; Blowey y Edmonson, 1995; Bedolla, 2004).

La prueba consiste en el agregado de un detergente a la leche, el alquil-aril sulfonato 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 (Smith 1990; Saran y Chaffer, 2000; Medina y Montaldo, 2003).

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 (Smith 1990; Saran y Chaffer, 2000; Medina y Montaldo, 2003).

Es decir, permite determinar la respuesta inflamatoria con base en la viscosidad del gel que se forma al mezclar el reactivo (púrpura de bromocresol) con la misma cantidad de leche en una paleta con cuatro pozos independientes permitiendo evaluar cada cuarto independientemente (Smith 1990; Saran y Chaffer, 2000; Medina y Montaldo, 2003).

Desafortunadamente esta prueba es muy subjetiva y tiene que hacerse al lado de la vaca durante el ordeño (lo que interfiere con el manejo del ordeño) (Pérez, 1986).

La Prueba de California es un método de diagnóstico que posee una sensibilidad del 97% y una especificidad del 93%. Sus ventajas principales son:

1. 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.
2. El material extraño no interfiere con la prueba (pelo u otro material).
3. La prueba es simple y no requiere de equipo costoso.
4. La paleta es fácil de limpiar después de cada uso (Báez, 2002).

A pesar de sus ventajas, la técnica presenta los siguientes inconvenientes:

1. 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.
2. Pueden presentarse falsos positivos en leche de animales con menos de diez días de paridos o en vacas próximas a secarse.
3. La mastitis clínica aguda da resultados negativos, debido a la destrucción de los leucocitos por las toxinas provenientes de los microorganismos presentes (Báez, 2002).

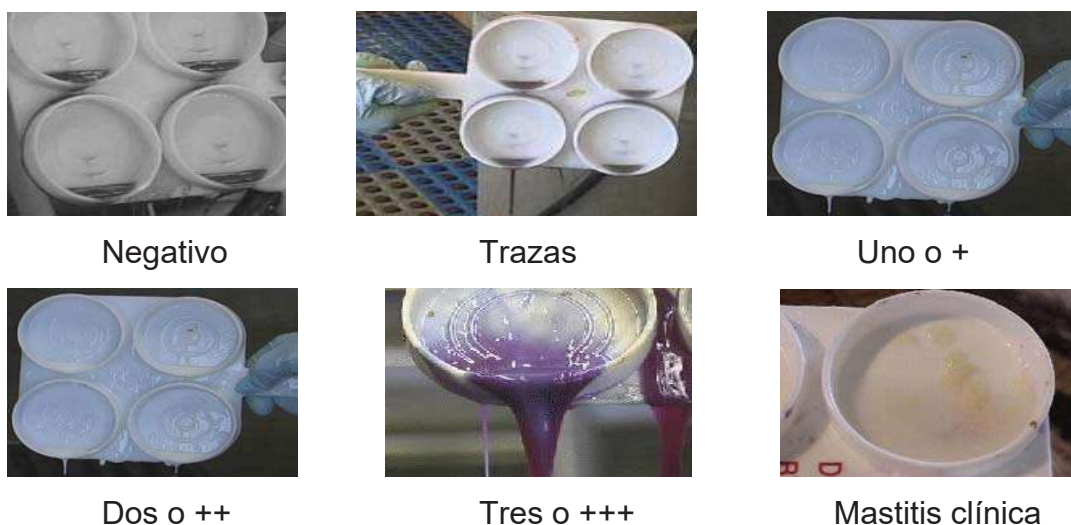


Figura 11. Interpretación de los resultados de la Prueba de California

Cuadro 2. Interpretación de resultados de la Prueba de California para Mastitis

Escala de CMT	Rango relativo del nivel de células somáticas (células/ml)
Negativo	<200.000
Trazas	150.000-500.000
1	400.000-1.500.000
2	800.000-5.000.000
3	>5.000.000

Fuente: NMC, 1999; Saran y Chaffer, 2000.

2.2.4.2.- Prueba de Wisconsin para Mastitis (WMT)

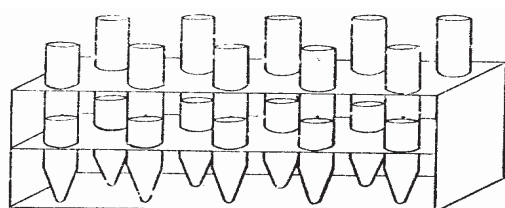
La Prueba de Wisconsin para Mastitis (WMT), fue diseñada para el uso en el laboratorio, y es utilizada para estimar el contenido de células somáticas de muestras de leche fresca mezclada o leche de tanques de enfriamiento, así como para muestreo de vacas individuales. Se utiliza una solución similar 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, 1997; NMC, 1999; Bedolla, 2004).

La técnica consiste en utilizar un tubo graduado en milímetros en donde se depositan 2 ml de leche y una mezcla de 2 ml de reactivo para CMT con agua

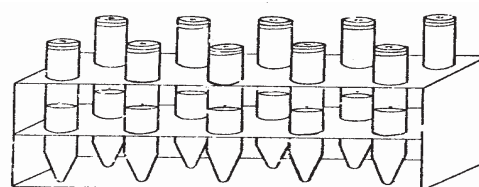
destilada (1:1) ambas a temperatura ambiente. Enseguida se agita durante 10 segundos, horizontalmente y de izquierda a derecha. Se deja reposar 10 segundos y posteriormente se invierten los tubos durante otros 10 segundos.

Una vez transcurrido el tiempo, se procede a realizar la lectura en el tubo por debajo de la espuma que se forma (Figura 12). Los resultados se relacionan con la escala graduada en mililitros del tubo y su valor de células somáticas, empleando para su interpretación una tabla específica para la prueba (Cuadro 3) (Fernández, 1997).

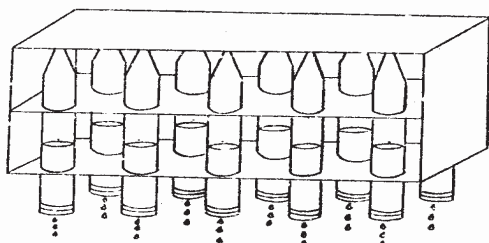
Los rebaños con una puntuación baja entre 3 y 12 están en condiciones buenas a regular, mientras que los rebaños con puntuaciones superiores a 12 requieren de atención inmediata (Carrión, 2001).



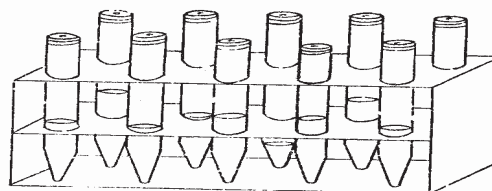
1) 3ml de leche + 3ml reactivo.



2) Se agitan por 10 seg.
y se dejan reposar por 15 seg.



3) Se voltean durante 15 seg.



4) Se procede a la lectura.

Figura 12. Procedimiento Wisconsin WMT para el diagnóstico de la mastitis subclínica

Cuadro 3. Interpretación para prueba de Wisconsin

Wisconsin (milímetros)	Conteo Celular Somático	Pérdida de producción
3	140,000	
4	165,000	5%
5	195,000	
6	225,000	
7	260,000	
8	300,000	8%
9	340,000	
10	380,000	
11	420,000	
12	465,000	
13	515,000	
14	565,000	
15	620,000	
16	675,000	
17	730,000	9-18%
18	790,000	
19	855,000	
20	920,000	
21	990,000	
22	1,055,000	
23	1,130,000	
24	1,200,000	
25	1,200,000	
26	1,360,000	
27	1,440,000	
28	1,525,000	
29	1,610,000	
30	1,700,000	
31	1,800,000	19-25%
32	1,920,000	
33	2,030,000	
34	2,180,000	
35	2,280,000	

Fuente: Philpot y Nickerson, 1992.

2.2.4.3.- Monitoreo del conteo de células somáticas

Con el nombre de células somáticas se designa a las células del propio organismo. Por tanto, las células somáticas son células corporales. Éstas pasan a la leche procedente de la sangre y del tejido glandular. El contenido de células somáticas en la leche nos permite conocer el estado funcional y de salud de la glándula mamaria en periodo lactante; debido a su estrecha relación con la composición de la leche, es un criterio de calidad muy importante (Wolter *et al.*, 2004; Bedolla, 2004).

La leche de una ubre sana presenta pocas células somáticas. En este caso se trata de células de tejido (células epiteliales) y células inmunes (neutrófilos polimorfonucleares, granulocitos, macrófagos, linfocitos). El porcentaje de los diferentes tipos de células somáticas en la leche de las glándulas mamarias sanas es como sigue: a) macrófagos (60 %); b) linfocitos (25 %); y c) neutrófilos o leucocitos polimorfonucleares (15 %) (Philpot, 2001; Wolter *et al.*, 2004; Bedolla, 2004).

De todas las células de la leche de un cuarto infectado, aproximadamente el 99 % serán leucocitos, mientras que el resto 1% serán células secretoras que se originan de los tejidos de la ubre. Juntos esos dos tipos de células constituyen la cuenta de células somáticas (CCS) de la leche que comúnmente es expresada en mililitros (ml) (Philpot, 2001; Bedolla, 2004).

El conteo de células somáticas (CCS) es la medición más ampliamente utilizada para supervisar en estado inflamatorio de las glándulas mamarias, y puede

ser realizada en la leche de: 1. cuartos individuales; 2. vacas individuales; 3. el hato completo; 4. un grupo de hatos (Philpot, 2001; Bedolla, 2004).

La infección intramamaria es el principal factor causante de cambios en la CCS en la leche. Cuando los microorganismos causantes de mastitis invaden un cuarto de la ubre y empiezan a multiplicarse o cuando el número de estos aumenta significativamente en un cuarto infectado, el organismo de la vaca tiende a reclutar leucocitos para combatir a dichos microorganismos causantes de la mastitis (Philpot, 2001; Bedolla, 2004).

Las glándulas mamarias que nunca se han infectado normalmente tienen CCS de 20,000 a 50,000/ml. En grandes poblaciones de vacas, 80 % de los animales no infectados tendrán un CCS menor de 200,000/ml y 50% menor de 100,000/ml. Una razón de las cuentas ligeramente elevadas en animales no infectados es que algunos cuartos tuvieron una infección previa de la cual no se han recuperado totalmente (Philpot, 2001; Bedolla, 2004; Pérez *et al.*, 2005).

Según Philpot, (2001) datos obtenidos de numerosos estudios, señalan que la mayoría de las vacas con una CCS menor de 200,000/ml probablemente no están infectadas, y que la mayoría de esas vacas con cuentas mayores de 300,000/ml probablemente están infectadas. Mientras que aquellas con una CCS entre 200,000 y 300,000/ml son difíciles de interpretar (Fernández, 1997).

En base a lo anteriormente expuesto, cabe señalar que el registro ordenado de los resultados de las pruebas de monitoreo mensual de vacas individuales nos va

a proporcionar información muy útil para el manejo del hato, para el ganadero, y el veterinario. Aunque estas pruebas de monitoreo no diagnostican la causa o tipo de infección o si hay una lesión presente, si alertan al ganadero y al veterinario de que un problema se esta desarrollando, por lo que se debe poner mucha atención al respecto (Fernández, 1997; Bedolla, 2004; Pérez *et al.*, 2005).

2.2.4.4.- 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 (Figura 13) (Pérez *et al.*, 2005).



Figura 13. Procedimiento de siembra, incubación e identificación

Al extraer muestras se deben descartar dos o tres chorros de leche y se deben asegurar que las tetas estén bien limpias y que se han frotado los extremos de

las mismas durante algunos segundos con un algodón húmedo con 70% de alcohol, antes y después de recoger las muestras en un recipiente esterilizado se deben congelar hasta entregarlas al laboratorio. Los procedimientos bacteriológicos son esenciales para la selección de los agentes terapéuticos que tienen especificidad para el germen presente (Pérez *et al.*, 2005).

2.2.4.5.- Conteo de células somáticas por 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, aun mantiene su utilidad para los trabajos de investigación (Saran y Chaffer, 2000).

El método tradicional de recuento de células somáticas es el “recuento directo” por microscopio utilizando un agrandamiento de 500x. 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 (Figura 14). Los tanques de leche a granel con más de un millón de células por mililitro de leche, sugieren que por lo menos el 40% de las vacas de la explotación tienen mastitis (Carrión, 2001).



Figura 14. Procedimiento de microscopia directa

Los recuentos de menos de un cuarto de millón, indican que no más del 10% de las vacas están clasificadas bajo el número 2 de la escala de calificación en la prueba de California. Este método es más preciso, pero también el que consume más tiempo y requiere además equipo costoso. En la Federación Internacional de leche existe una descripción del método “A”: Se coloca la leche en una placa de vidrio y una persona cuenta las células visibles en el microscopio. Sin embargo, es difícil que una persona alcance a contar más de 10 muestras por hora (Carrión, 2001).

Es por eso que los procedimientos directos de recuentos por microscopio deben considerarse anticuados, ya que no pueden utilizarse para analizar un gran número de muestras en poco tiempo y con alta precisión (Carrión, 2001).

2.2.5.- 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 Counter Coulter (Coulter, Inglaterra) (Saran y Chaffer, 2000; Bedolla, 2004).

2.2.5.1.- Método bactoscan

Se utiliza para obtener un recuento total de las bacterias en la leche cruda. Es un aparato electrónico y rápido (hasta 80 muestras por hora). Las bacterias son aproximadamente diez veces menores que las células somáticas (Carrión, 2001).

2.2.5.2.- Método fluoro-opto-electrónico (Fossomatic) y Counter Coulter

Estos dos aparatos poseen alta correlación con la microscopía óptica, por lo que proporcionan una medida segura en el recuento de células somáticas. Sin embargo, se pueden presentar variaciones en el recuento en las mismas muestras cuando se realizan con los dos aparatos debido a la diferencia de operación de cada uno de ellos (Saran y Chaffer, 2000; Bedolla, 2004).

El Fossomatic basa su cálculo en la tinción fluorométrica del material nuclear, mientras que el Counter Coulter cuenta el número de impulsos eléctricos resultantes de las partículas que pasan entre dos electrodos (Figura 15) (Djabri *et al.*, 2002). Es decir, cuenta partículas de un diámetro determinado, que para el caso serían las células, pero en el rango de recuento entrarían otras partículas, aumentando ligeramente el valor en comparación con el Fossomatic (Saran y Chaffer, 2000; Bedolla, 2004).

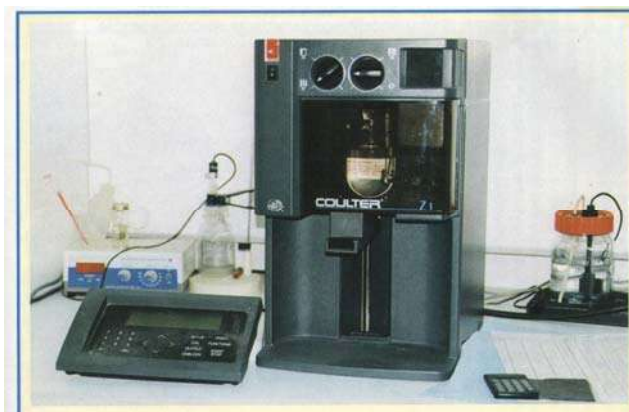


Figura 15. Aparato Counter Coulter

El Fossomatic consiste en el filtrado de una solución de leche mezclada con detergente (Triton X-100 EDTA) a través de una membrana con poros finos. Un procedimiento colorimétrico basado en la reacción con el ADN de las células es entonces utilizado para determinar el contenido de ADN que esta relacionado directamente con el número de células presentes en la muestra inicial (Djabri *et al.*, 2002; Bedolla, 2004).

Procedimiento: Se coloca una muestra de leche de 5ml de leche a 40° C. En el Fossomatic se tiñen las células somáticas con un colorante fluorescente para obtener una reacción solo con el ADN de las células. Es por eso que las partículas sucias y los glóbulos de los lípidos no se suman al número de las células somáticas. La muestra pasa frente a una luz especial y un detector registra cada célula somática. Entre cada muestra el aparato limpia su sistema de flujo para evitar el efecto del arrastre de una muestra a otra. Todas estas funciones son automáticas (Carrión, 2001).

Las funciones principales del operario son las de preparar los reactivos cada mañana, colocar los portamuestras en la cinta transportadora del aparato y esperar en segundos los resultados del número de células somáticas. Asegurar que siga existiendo una buena relación entre los resultados del aparato y los resultados del método tradicional, analizando unas muestras con ambos métodos (por ejemplo cada semana) (Carrión, 2001).

Son obvias las ventajas de este equipo electrónico de recuento. Es independiente del operario, mide con alto grado de precisión y exactitud, y además da la posibilidad de registrar los datos automáticamente (Carrión, 2001).

La desventaja de este equipo es su alto costo (44,000.00 a 176,000.00 dólares) sin embargo, al estar el equipo preparado para analizar un gran número de muestras, el costo por muestra es mucho más bajo que otros métodos utilizados para el recuento de células somáticas (Figura 16) (Carrión, 2001).



Figura 16. Método fluoro-opto-electrónico (Fossomatic)

En síntesis, se puede decir que el Fossomatic es un contador específico de ADN basado en un principio óptico de fluorescencia. Debido a que el bromuro de etidio penetra en la célula y forma un complejo fluorescente con el ADN nuclear, cada célula produce un pulso eléctrico que se amplifica y se registra (Martínez *et al.*, 2003).

La automatización de este proceso significa que pueden analizarse un gran número de muestras por hora en los laboratorios de pruebas de leche. En la mayoría de los casos, el Fossomatic utiliza leche fresca o conservada. Aunque han sido muy pocos los estudios que se han llevado a cabo con leche congelada (Barkema *et al.*, 1997), ésta puede ser útil en caso de una avería en el equipo de CCS, o en los protocolos biológicos o bacteriológicos para muestras de leche congelada (Martínez *et al.*, 2003; Bedolla, 2004).

III.- CONCLUSIONES

Los métodos de detección de la mastitis bovina son un recurso o herramienta que permite identificar el tipo de infección ya sea de forma subclínica o clínica que puede presentarse dentro de un hato lechero, el método que se elija para determinar las pruebas será esencial para tener un diagnóstico más preciso.

El prevenir a los ganaderos con este tipo de métodos ayuda a que la enfermedad no se disemine más en el establo, permitiendo tomar las medidas necesarias a tiempo contra la mastitis.

Es cierto que no todos los métodos son muy eficientes por lo que se debe considerar con detalle cual se encuentra entre las condiciones económicas del productor y la eficacia del método utilizado.

IV.- REFERENCIAS

Ávila TS. 1984. Producción intensiva de Ganado lechero. Anatomía y fisiología de la glándula mamaria. Edit. Continental. México. pp 139-157.

Báez GJJ. 2002. Estudio epidemiológico de mastitis subclínica bovina en el sector II de Tétaro, Michoacán. (Tesis de licenciatura). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de medicina Veterinaria y Zootecnia. Morelia, Michoacán, México. pp 27-28.

Bannerman DD, Paape MJ, Lee J, Zhao X, Hope JC, and Rainard P. 2004. Escherichia Coli and Staphylococcus Aureus. Elicit Differential Innate Immune Responses Following Intramammary Infection. Clinical Diagnostic Laboratory Immunology. 11 (3): 463-472.

Bedolla CC. 2004. Mastitis Bovina. Cuatro Vientos. No 41. Febrero-Marzo. UMSNH. pp. 24-26.

Bedolla CC. 2004. Métodos de detección de la mastitis bovina. FMVZ-UMSNH. 8 pp

Blowey R. y Edmonson P. 1995. Control de la mastitis en granjas de vacuno de leche. Acribia. Zaragoza. 208 pp.

Carrión GM, 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.

Charles A. 1984. Ciencia de la leche. Principios de técnica lechera. Edit. CECSA, México. 310 pp.

Djabri B, Barielle N, Beaudeau F, Seegers H. 2002. Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta analysis. Vet. Res. 33:335-357.

Erskine RJ. 2001. Mastitis Control in Dairy Herds. In: Radostits OM, editor. Herd Health Food Animal Production Medicine. Philadelphia, Penn: WB Saunders Co. pp 397-433.

Fernández del Río JA. 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.

Hansen PJ, Soto P, and Natzke RP. 2004. Mastitis and Fertility in Cattle-Possible Involvement of Inflammation or Immune Activation in Embryonic Mortality. American Journal of Reproductive Immunology. 51: 294-301.

Hillerton JE, and Berry EA. 2005. A review. Treating Mastitis in The Cow-a Tradition or an Archaism. *Journal of Applied Microbiology*. 98: 1250-1255.

Kerr DE, and Wellnitz O, 2003. Mammary Expression of News Genes to Combat Mastitis. *J Anim. Sci.* 81 (suppl.3): 38-47.

Martínez JR, Gonzalo C, Carriedo JA y San Primitivo F. 2003. Effect of Freezing on Fossomatic Cell Counting in Ewe Milk. *J. Dairy Sci.* 86:2583–2587.

Medina C. M., y Montaldo V. H. 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.

Morresey PR.1999. Bovine Mastitis. In: Howard JL, Smith RA, editors. *Current Veterinary Therapy 4 Food Animal Practice*. Philadelphia, Penn: WB Saunders Co, 563-568.

Norberg, E. Hogeveen, H. Korsgaard, I. R. Friggens, N. C. Sloth, K. H. M. N. and Løvendahl, P. 2004. Electrical Conductivity of Milk: Ability to Predict Mastitis Status. *J. Dairy Sci.* 87:1099–1107.

Perez DM. 1986. Manual sobre ganado productor de leche. Edit. Villicaña S.A., México. pp 710-744.

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.

Philpot WN. y Nickerson SC. 1992. Mastitis: El contra ataque. Publicado por Surge Internacional. Naperville, IL. U.S.A.

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.

Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. 2000. Veterinary Medicine A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses. 9th ed. London, GB: WB Saunders Co.

Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. 2002. Medicina Veterinaria. Mastitis Bovina. Edit. Mcgraw-hill. 9^o Edición. Vol 1. Madrid, España. pp 728, 810.

Saran A, y Chaffer M. 2000. Mastitis y calidad de leche. Inter-Médica. Buenos Aires. 194 pp.

Smith BP. 1990. Large Animal Internal Medicine. St Louis, Missouri: The C. V. Mosby Co.

Wolter W, Castañeda H, Kloppert B, y Zschöck M. 2004. Mastitis bovina. Prevención, diagnóstico y tratamiento. Editorial Universitaria. Universidad de Guadalajara. 146 pp.